

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究
カンピロバクター試験法に関する検討

研究協力者 齊藤志保子 所属機関 秋田県健康環境センター

研究要旨

カンピロバクターの培養では微好気培養が必要であり、食品等を検体とする場合、増菌培養に微好気培養が必要であることが本菌の食品における汚染を調べることの障害となっている。一方、以前の検討から、通気性の無い特殊フィルムを用いたストッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、市販の鶏肉を検体として、このような培養の妥当性を評価することにした。市販鶏肉 10 検体を、それぞれ特殊フィルムを用いたストッカー袋を用いた好気培養および通常ストッカー袋を用いて好気培養と微好気培養し、カンピロバクターの分離結果を比較検討した。この検討の結果では、特殊フィルムを用いたストッカー袋と通常ストッカー袋を用いた増菌培養の差は明らかではなかった。またストッカー袋からできるだけ空気を追い出し、シールして培養した場合は好気培養でも微好気培養と同等の結果が得られた。

A. 研究目的

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊な培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、モニターを行うことは困難であった。以前の検討から通気性の無い特殊フィルムを用いたストッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、8 箇所の機関で、同一な条件で市販の鶏肉について汚染実態調査を行い、通気性の無い特殊フィルムを用いたストッカー袋を用いた試験方法の妥当性を検証するこ

とにした。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部より配布された通気性の無い特殊フィルムを用いたストッカー袋及び通常ストッカー袋に入れられた凍結ボルトン培地を解凍し、添加液を封入した小袋を破壊後、混和し実験に用いた。培養は、通常インキュベーターを用いた好気培養で行った。対照として微好気培養を通常ストッカー袋に入れた自家調製のボルトン培地を用いて実施した。試験方法は、分担研究者が示すカンピロバクター試験

法を用いた（分担研究報告書参照）。10 検体の市販の鶏肉（内 5 検体の生のもも肉、5 検体の凍結もも肉）を購入し、供試した。増菌後、mCCDA 寒天平板培地、および Butzler 寒天培地に接種し、カンピロバクターの疑われる集落を分離し、性状を確認し同定した。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果（実験結果には考察を含む）

特殊フィルムを用いたストマッカー袋を使用した好気培養では生鶏肉で 5 検体中 2 検体、冷凍鶏肉では 5 検体中 1 検体がカンピロバクター分離陽性であった。通常ストマッカー袋を使用した好気培養と微好気培養では、生鶏肉で 3 検体、冷凍鶏肉で 1 検体が陽性であった。（表 1）

いずれかの増菌培養系で陽性であった検体数は生鶏肉で 3 検体、冷凍鶏肉では 2 検体、計 5 検体であり、分離菌種はすべて *Campylobacter jejuni*（以下 *C. jejuni*）であった。

検体 No. 5（生鶏肉）と N. 7（冷凍鶏肉）は特殊フィルムを用いたストマッカー袋の培養系でのみ *C. jejuni* が分離されなかった。No. 6（冷凍鶏肉）は特殊フィルムを用いたストマッカー袋の培養系でのみ *C. jejuni* が分離された。No. 5～7 では分離陽性であった培養系でも増菌時間が 24 時間で選択培地に接種した場合は平板上のカンピロバクター様コロニー数が非常に少なかった。（表 2）今回、定量試験は実施しなかったが、これらの検体はカンピロバクター汚染菌数が少なかったと考えられ、このことにより培養系別の

分離結果が異なった可能性も考えられた。

通常ストマッカー袋による好気培養と微好気培養ではカンピロバクター分離結果が同じであった。検体接種後、ストマッカー袋からできるだけ空気を追い出し、シールして培養することにより、好気条件の培養でも微好気培養と同等な結果が得られたものと考えられた。

E. 結論

市販鶏肉からのカンピロバクター分離結果について、特殊フィルムを用いたストマッカー袋と通常ストマッカー袋利用の差は明らかではなかった。またストマッカー袋からできるだけ空気を追い出し、シールして培養した場合は好気培養でも微好気培養と同等の結果が得られると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 増菌培養方法別カンピロバクター分離陽性数

検体種	検体数	好気培養		微好気培養
		特殊ストマッカー袋	通常ストマッカー袋	通常ストマッカー袋
生鶏肉	5	2	3	3
冷凍鶏肉	5	1	1	1
合計	10	3	4	4

表2 ボルトン培地を用いた市販鶏肉からのカンピロバクター検査結果

検体No	検体種	分離陽性菌種	好気培養				微好気培養					
			特殊ストマッカー袋		通常ストマッカー袋		通常ストマッカー袋					
			24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
			mCCDA	Butzler	mCCDA	Butzler	mCCDA	Butzler	mCCDA	Butzler	mCCDA	Butzler
1	生鶏肉	C. jejuni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	生鶏肉	C. jejuni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	生鶏肉		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	生鶏肉		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	生鶏肉	C. jejuni	-	-	-	-	+*	+	+*	+	+	+
6	冷凍鶏肉	C. jejuni	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
7	冷凍鶏肉	C. jejuni	-	-	-	-	-	+	-	+	+*	+
8	冷凍鶏肉		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	冷凍鶏肉		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	冷凍鶏肉		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+*: 選択分離平板上のコロニー数が数個

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究

カンピロバクター試験法に関する検討

研究協力者 藤田雅弘 所属機関 群馬県衛生環境研究所

研究要旨

カンピロバクターの検査には、微好氣的条件下での培養が必要であり、特別に設備や器材を必要とするため、本菌の食品における汚染を調べる際に支障をきたすことがある。一方、以前の検討から、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋（気密袋）を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示唆されている。そこで、市販の鶏肉を検体として、カンピロバクターの検査方法として、好氣的条件下で、気密袋を用いた培養方法の妥当性を検討することにした。市販鶏肉 10 検体を、 -20°C で凍結処理し検査に用いた。気密袋および通常のストマッカー袋を用いて好氣的条件下で増菌培養し、対象として、通常のストマッカー袋を用いて微好気条件下で増菌培養を実施し、カンピロバクターの検出数を比較した。また、分離培地として、mCCDA 寒天培地及び Butzler 寒天培地の 2 種類を用いた。この検討の結果、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いた増菌培養方法は、通常のストマッカー袋を用いて微好気条件下で培養する方法と同等であり、好氣的条件下で培養することが可能なことから、特別な設備や器材を確保する必要がないため、一般的な食品検査施設において、実施される検査方法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

従来、カンピロバクターは、微好氣的条件下で、発育することが知られており、食品のカンピロバクターの汚染実態調査を行う際には、炭酸ガス培養器、簡易ガス発生装置及び嫌気ジャー等の特殊な装置や機材が必要とされている。

このような装置や機材が無い場合、多くの食品検査施設では、カンピロバクターのモニタリングを行うことは困難であった。当研究班における従前の検討結果から、通気性の無い特殊

フィルムを用いたストマッカー袋（気密袋）を用いることにより、好気培養下においても、本菌の増菌培養が可能であることが示唆された。このことから、8 箇所の機関で、同一な条件で市販の鶏肉について汚染実態調査を行い、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いた培養方法の有用性について検討した。

B. 研究方法

ストマッカー袋は、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部より配布された。ボルトン培地を通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋及び通常のストマッカー袋に入れ凍結後に配送されたものを解凍し、添加液を封入した小袋を破壊後、混和し増菌培地として実験に用いた。また、通常のストマッカー袋にボルトン培地（OXOID 社）の培地を同様に入れ、微好気条件下で増菌培養する方法と比較した。

実験に用いた市販鶏肉は、低温流通されているものを 10 検体購入し、 -20°C で約 1 週間冷凍保存したものを用いた。鶏肉は、25 g ずつ計量し、それぞれの増菌培地に加えた。

2 種類の凍結配布されたストマッカー袋は、シーラーにてシールし、好気的条件下で増菌培養を実施した。また、対照とした通常のストマッカー袋は、微好気的条件下で増菌培養を行った。それぞれの増菌培地について、 37°C にて 4 時間培養後に、 42°C にて 20 時間培養する温度シフトを実施した。これら増菌培養液の 1 白金耳量を、mCCDA 寒天培地及び Butzler 寒天培地に塗抹し、 42°C 48 時間微好気条件下で培養した。平板上に生じた疑わしい 3 コロニーを釣菌し、グラム染色、運動性、カタラーゼ、オキシターゼ、ラテックス凝集テスト及び生化学的性状誌試験を実施した。

C. 研究結果

通常のストマッカー袋を用いて微好気的条件下で増菌培養した場合、カンピロバクターは 10 検体中 8 検体から検出された。また、凍結配布された通常のストマッカー袋を用いて好気的条件下で増菌培養した場合、10 検体中 8 検体から検出された。気密袋を用いた好気的条

件下で増菌培養した場合は、10 検体中 7 検体からカンピロバクターが検出された。いずれの方法による検出率は、ほぼ同等であり、微好気的条件下での増菌培養を実施することは必ずしも必要であるとは考えられなかった。

通常のストマッカー袋で、微好気的条件下で増菌培養し、分離培地に Butzler 寒天培地を用いた場合、8 検体がカンピロバクター陽性であったが、その中の 3 検体は mCCDA 寒天培地を用いた場合には検出できなかった。また、好気的条件下で増菌培養した場合、凍結配布された通常のストマッカー袋では、分離培地に Butzler 寒天培地を用いた場合、8 検体がカンピロバクター陽性であったが、その中の 5 検体は mCCDA 寒天培地を用いた場合には検出できなかった。更に、気密袋では、分離培地に Butzler 寒天培地を用いた場合、7 検体がカンピロバクター陽性であったが、その中の 4 検体は mCCDA 寒天培地を用いた場合には検出できなかった。これらのことから、鶏肉を汚染しているカンピロバクターについて、凍結などによる損傷菌を含めて検出する方法としては、ボルトン培地による温度シフトを実施し、分離培地として Butzler 寒天培地を用いる方法が適していると考えられた。

E. 結論

凍結等により損傷を受け、検出が困難であるとされているカンピロバクターを、鶏肉等から検出する場合、ボルトン培地による温度シフトを実施し増菌培養を行うことが推奨されている。増菌培を行う環境として、必ずしも微好気的条件を確保する必要はなく、ストマッカー袋に検体を入れ、シールし通常の孵卵器で培養することで検出することが可能であった。また、

分離培地としては、mCCDA 寒天培地よりも Butzler 寒天培地が適していたが、検査材料により、分離培養には複数の分離培地を併用することが望ましいと考えられた。カンピロバクターの検出率については、食品がカンピロバクターに汚染されている菌数に左右されることが考えられた。しかしながら、ストマッカー袋に検査材料を計りとり、ポルトン培地を10倍量加え、シールした後に、温度シフトを行い、好气的条件下で増菌培養を実施する検査方法は、特殊な検査設備や器材を必要としないことから広く一般的な食品検査施設で利用できるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

カンピロバクターの検出結果

品名	増菌培地	形態	培養条件	分離培地	分離菌
鶏もも肉(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	C.c
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏もも肉(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	C.c
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏皮肉(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	-
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏皮肉(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	-
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏胸肉(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	C.j
				バター	C.j
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	C.j
鶏胸肉(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	C.j
				バター	C.j
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏もも肉(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	C.j
				バター	C.j
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏もも肉(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	-
				バター	C.j
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏胸肉小間(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	-
				バター	-
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏胸肉小間(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	-
				バター	-
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏胸肉(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	-
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏胸肉(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	C.j
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏もも肉(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	-
				バター	C.j
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	C.c
鶏もも肉(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	-
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	-
鶏もも肉(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	C.j
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	C.c
鶏もも肉(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	C.j
				バター	C.c
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	C.c
鶏皮肉(冷凍処理)	ポルトン	ストマック袋	微好気	CCDA	C.j
				バター	C.j
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	C.j
鶏皮肉(冷凍処理)	ポルトン	気密袋	好気	CCDA	C.j
				バター	C.j
	ポルトン	ストマック袋	好気	CCDA	C.j

C.j: Campylobacter jejuni

C.c: Campylobacter coli

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究

カンピロバクター試験法に関する検討

研究協力者 小野一晃 埼玉県衛生研究所

研究要旨

カンピロバクターの培養では微好気培養が必要であり、食品等を検体とする場合、増菌培養に微好気培養が必要であることから、本菌の食品における汚染を調べることの障害となっている。一方、以前の検討から、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、市販の鶏肉を検体として、このような培養の妥当性を評価することにした。市販鶏肉 10 検体を、それぞれ特殊ストマッカー袋および通常のストマッカー袋を用いて好気培養と微好気培養を併用し、カンピロバクターの分離を試み、検討した。この検討の結果、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いた増菌培養は、微好気置換したものは有効であると思われた。この他、CCDA 培地を用いた場合には、一面に雑菌が発育してしまい目的菌の分離が困難な場合がみられたことから、Bolton 培地で増菌培養する際には、分離平板の検討等が必要と思われた。

A. 研究目的

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊な培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、モニターを行うことは困難であった。以前の検討から通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、8 箇所の機関で、同一な条件で市販の鶏肉について汚染実態調査を行い、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いた試験方法の妥当性を

検証することにした。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部より配布された通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋（ガス置換済）及び通常のストマッカー袋に入れられた凍結ボルトン培地を解凍し、添加液を封入した小袋を破壊後、混和し実験に用いた。培養は、通常のインキュベーターを用いた好気培養で行った。対照として自家調製のボルトン培地と通常のストマッカー袋を用い、ジャーの中でガス置換し、微好気状態 (O_2 :5%、 CO_2 :10%、

N₂:85%) で培養した。試験方法は、分担研究者が示すカンピロバクター試験法を用いた(分担研究報告書参照)。10 検体の市販の鶏肉(内 1 検体の生むね肉、2 検体の生のもも肉、7 検体の凍結もも肉)を購入し、供試した。増菌後、CCDA および Butzler 寒天平板培地に接種し、カンピロバクターの疑われる集落を分離し、性状を確認し同定した。なお、1 検体当たり、分離平板上に発育した 3 集落について、常法に基づきカンピロバクターの菌種同定を行った。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

表 1 に各手法による市販鶏肉からのカンピロバクター分離状況を示す。自家調製のボルトン培地と通常のスTMマッカー袋を用い、ジャーの中で微好気培養した試料では、分離平板として CCDA 培地を用いた場合に 1/10 検体 (10.0%)、Butzler 培地を用いた場合に 2/10 検体 (20.0%) から菌が分離された。分離平板に CCDA 培地を用いた場合には、2/10 検体 (20.0%) で雑菌の発育のため目的菌の分離が困難であった。

雑菌の多くは大腸菌であったが、Bolton 培地と CCDA 培地の組み合わせでは、これらの菌を抑えることができなかったことから、分離平板の検討等の必要性が示唆された。

また、通気性の無い特殊フィルムにより作られたスTMマッカー袋(ガス置換済)を用いた場合、CCDA と Butzler どちらの分離平板を用いた場合も 2/10 検体 (20.0%) から菌が分離された。今回、ガス置換済みのスTMマ

ッカー袋を用いることで、ジャーの中で微好気培養する通常法と変わらない結果が得られたことから、検査法として有効であると思われる。

一方、通常のスTMマッカー袋を用いて、好気条件で培養した試料からは、CCDA と Butzler どちらの分離平板を用いた場合も全く菌は分離できなかった。

なお、分離されたカンピロバクターはすべて *C. jejuni* であった。

E. 結論

通気性の無い特殊フィルムにより作られたスTMマッカー袋(ガス置換済)を用いた培養は、ジャーの中で微好気培養する通常法と変わらない結果が得られたことから、検査法として有効であると思われる。一方、CCDA 培地を用いた場合には、一面に雑菌が発育してしまい目的菌の分離が困難な場合がみられたことから、Bolton 培地で増菌培養する際には、分離平板の検討等が必要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 各手法による市販鶏肉からのカンピロバクター分離状況

No.	検体名	販売状態	産地	Bolton通常		微好気置換袋		ガス置換なし袋	
				CCDA	Butzler	CCDA	Butzler	CCDA	Butzler
1	むね肉	冷蔵	岩手	-	-	-	-	-	-
2	もも肉	冷蔵	岩手	-	-	-	-	-	-
3	もも肉	冷蔵	岩手	-	-	-	-	-	-
4	もも肉	冷蔵(解凍品)	ブラジル	-*	-	-	-	-	-
5	もも肉	冷蔵(解凍品)	ブラジル	-*	+	-	-	-	-
6	もも肉	冷凍	ブラジル	-	-	+	+	-	-
7	もも肉	冷凍	ブラジル	+	+	+	+	-	-
8	もも肉	冷凍	ブラジル	-	-	-	-	-	-
9	もも肉	冷凍	ブラジル	-	-	-	-	-	-
10	もも肉	冷凍	ブラジル	-	-	-	-	-	-

*雑菌発育のため目的菌の分離不可

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究

カンピロバクター試験法に関する検討

分担研究者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究協力者 石和 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

カンピロバクターの培養では微好気培養が必要であり、食品等を検体とする場合、増菌培養に微好気培養が必要であることから、本菌の食品における汚染を調べることの障害となっている。一方、以前の検討から、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、市販の鶏肉を検体として、このような培養の妥当性を評価することにした。市販鶏肉 10 検体を、それぞれ特殊ストマッカー袋および通常のストマッカー袋を用いて好気培養し、カンピロバクターの分離を試み、検討した。なお、対照実験として、嫌気ジャーおよびガスパックを用いて微好気培養を行った。この検討の結果、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いた増菌培養は、検体数を増やして評価する必要があると思われた。分離用の平板培地として mCCDA 培地および Butzler 培地を用いたところ、mCCDA 培地ではカンピロバクターを分離出来ない場合が多く見られた。

A. 研究目的

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊な培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、モニターを行うことは困難であった。以前の検討から通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、8 箇所の機関で、同一な条件で市販の鶏肉について汚染実態調査を行い、通気性

の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いた試験方法の妥当性を検証することにした。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部より配布された通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋及び通常のストマッカー袋に入れられた凍結ボルトン培地を解凍し、添加液を封入した小袋を破壊後、混和し実験に用いた。自家調製のボルトン培地は用い

なかった。培養は、通常のインキュベーターを用いた好気培養で行った。試験方法は、分担研究者が示すカンピロバクター試験法を用いた

(分担研究報告書参照)。10検体の市販の鶏肉(10検体はいずれも生のもも肉、凍結もも肉は対象とせず)を購入し、供試した。増菌後、mCCDA寒天平板培地およびButzler寒天平板培地に接種し、カンピロバクターの疑われる集落を分離し、性状を確認し同定した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果(実験結果には考察を含む)

①検体からの分離率および分離された菌種について。

C. jejuni または *C. coli* が検出された検体は、10検体中7検体(No. 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10)であった(検出率70%)。

うち、*C. jejuni*のみ検出された検体は5検体(No. 2, 4, 5, 9, 10)であり、*C. jejuni* および *C. coli* が検出されたのは1検体(No. 3)、*C. coli*のみが検出されたのは1検体(No. 6)であった。

②増菌培養時間(24時間、44時間)の結果比較について。

C. jejuni・*C. coli*が検出された検体では、すべてにおいて増菌培養時間24時間で検出されていた。一方、24時間増菌培養で菌を検出した検体のうち、44時間増菌では菌が検出されない場合が多かった(No. 2, 3, 4, 9)。

今回用いたボルトン培地(及び培養パック)による増菌を24時間以上行くと、カンピロバクターの死滅が始まると推測される。あるいは44時間培養の時点ではカンピロバクターよりも夾雑菌の成育が優勢になり、平板培地に塗布した場合に分離が困難になる場合もあると考

えられる(下記参照)。

③分離用平板培地による培養時のカンピロバクターおよび夾雑菌の出現状況について。

カンピロバクターが検出されず、平板培地に夾雑菌が出現する検体が10検体中2検体あった(No. 1, 8)。カンピロバクター、夾雑菌ともに平板培地に出現した検体は6検体あった(No. 2, 3, 4, 6, 9, 10)。カンピロバクターのみが平板培地に出現した検体は1検体のみ(No. 5)であり、カンピロバクター、夾雑菌ともにまったく出現しなかった検体も1検体(No. 7)あった。

また、24時間増菌によってカンピロバクターが分離されたにも関わらず、増菌培養時間が44時間に及ぶと分離できなかった例が多く(上記参照)、これらの検体由来の分離用平板培地上には *Acinetobacter* または *Pseudomonas* 属菌、大腸菌などが夾雑菌として分離された。一方、24時間増菌培養、44時間増菌培養ともにカンピロバクターを分離した検体からは、夾雑菌が分離されなかった(No. 5)。

夾雑菌が分離されなかった検体を用いた場合には、増菌培養時間24時間、44時間ともにカンピロバクターが検出されており、より効果的なカンピロバクター検出のためには、夾雑菌の増殖による検出率への影響を排除する必要があると考えられる。今後、増菌培養中の夾雑菌の増殖をより効果的に抑制するための検討が必要であると思われる。

④増菌培養条件(好気・微好気・特殊フィルムパック使用による微好気)と検出状況の関係について。

C. jejuni が分離された検体について、酸素透過性パック・酸素非透過性特殊フィルムパック・微好気ジャーによる培養、3条件による分

離情況に明確な差異は見られなかった。*C. coli* のみが検出された検体においては微好気ジャーによる培養においてのみ菌が検出されたが、検体数が1例のみであり、*C. coli* において微好気ジャーが他の条件に比べ有効であると判断することは難しい。今回、酸素非透過性特殊フィルム製パックと酸素透過性従来型パックに有意な性能差が見られなかった一方、対照実験として行った嫌気ジャーとガスパックを用いた微好気条件培養と比較しても、特殊フィルム製パック、酸素透過性パックとも、ほぼ同様の検出結果を得ていることから、ボルトン培地を用いて培養した場合、好気条件においてもある程度カンピロバクターが成育できる可能性が示唆された。

⑤平板培地の種類と検出情況の關係について。

mCCDA 培地と Butzler 培地により分離培養を行ったところ、殆どの検体において、Butzler 培地のみによりカンピロバクターが分離された (No. 2, 3, 4, 6, 9)。mCCDA 培地にはカンピロバクターのコロニーが出現せず、夾雑菌 (大腸菌) が旺盛に成育していた。Butzler 培地においても夾雑菌が出現する場合もあったが (2, 3, 4, 6, 9, 10)、あくまで夾雑菌コロニーの出現頻度は低く、カンピロバクターのコロニーを十分に目視により確認し、分離培養が可能であった。

尚、mCCDA 培地にも Butzler 培地にもほぼ純培養の状態でカンピロバクターが出現する検体もあった (No. 5)。

上記の結果から、今回使用したボルトン培地および培養条件では、増菌培養中に夾雑菌が増殖し、mCCDA 培地上での分離培養時に夾雑菌が優勢となり、カンピロバクターが分離できなかったと推測される。

E. 結論

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部より配布された通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋及び通常のストマッカー袋に入れられた凍結ボルトン培地による増菌培養を行ったところ、両者によるカンピロバクターの検出率等に有意な差は見られなかった。

ボルトン培地を用いた増菌を行う場合、増菌培養中にカンピロバクター以外の夾雑菌の増殖が見られ、増菌培養後の分離平板培地による検出が困難になる場合があると考えられた。ボルトン培地を用いた増菌を行い、カンピロバクターを効果的に検出するためには、増菌中にカンピロバクター以外の菌の増殖を効果的に抑制することが重要であると考えられる。

ボルトン培地を用いた増菌培養後に平板培養によるカンピロバクターの分離を行うにあたり、mCCDA 培地では夾雑菌の増殖が優勢になる場合が見られた。分離培地として mCCDA のみを使用すると、カンピロバクターが十分に検出できない可能性が予測され、これを防ぐために Butzler 培地等の二次培地の併用が必要となると結論された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

市販鶏肉からのカンピロバクター分離状況 (表)

検体：市販鶏肉 (皮付き腿肉、すべて非凍結品、検査当日購入)

検体No.	増菌	培養条件	検出結果(分離培地名)	コロニー出現状況(mCCDA)	コロニー出現状況(Butzler)
1	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	ND	コロニーなし	コロニーなし
	48h		ND	夾雑菌のみ	コロニーなし
	24h	b(通常フィルムパック)	ND	夾雑菌のみ	コロニーなし
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	24h	c(微好気ジャー)	ND	コロニーなし	コロニーなし
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
2	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		ND	夾雑菌のみ	コロニーなし
	24h	b(通常フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		ND	夾雑菌のみ	コロニーなし
	24h	c(微好気ジャー)	ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
3	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		<i>C. coli</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	24h	b(通常フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	24h	c(微好気ジャー)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
4	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		ND	夾雑菌のみ	コロニーなし
	24h	b(通常フィルムパック)	ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	24h	c(微好気ジャー)	ND	夾雑菌のみ	コロニーなし
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
5	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクターのみ	カンピロバクターのみ
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクターのみ	カンピロバクターのみ
	24h	b(通常フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクターのみ	カンピロバクターのみ
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクターのみ	カンピロバクターのみ
	24h	c(微好気ジャー)	<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクターのみ	カンピロバクターのみ
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクターのみ	カンピロバクターのみ
6	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	48h		ND	夾雑菌のみ	コロニーなし
	24h	b(通常フィルムパック)	ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	24h	c(微好気ジャー)	<i>C. coli</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		<i>C. coli</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
7	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	ND	コロニーなし	コロニーなし
	48h		ND	コロニーなし	コロニーなし
	24h	b(通常フィルムパック)	ND	コロニーなし	コロニーなし
	48h		ND	コロニーなし	コロニーなし
	24h	c(微好気ジャー)	ND	コロニーなし	コロニーなし
	48h		ND	コロニーなし	コロニーなし
8	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	24h	b(通常フィルムパック)	ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	24h	c(微好気ジャー)	ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
9	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクターのみ
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクターのみ
	24h	b(通常フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	24h	c(微好気ジャー)	<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		ND	夾雑菌のみ	夾雑菌のみ
10	24h	a(酸素非透過性特殊フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクター、夾雑菌	カンピロバクターのみ
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	24h	b(通常フィルムパック)	<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクター、夾雑菌	カンピロバクター、夾雑菌
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler)	夾雑菌のみ	カンピロバクター、夾雑菌
	24h	c(微好気ジャー)	<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクター、夾雑菌	カンピロバクターのみ
	48h		<i>C. jejuni</i> (Butzler, mCCDA)	カンピロバクターのみ	カンピロバクターのみ

ND: not detected

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究

カンピロバクター試験法に関する検討

研究協力者 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

カンピロバクターの培養では微好気培養が必要であり、食品等を検体とする場合、増菌培養に微好気培養が必要であることから、本菌の食品における汚染を調べることの障害となっている。一方、以前の検討から、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、市販の鶏肉を検体として、このような培養の妥当性を評価することにした。市販鶏肉 7 検体を、それぞれ特殊ストマッカー袋および通常のストマッカー袋を用いて好気培養し、カンピロバクターの分離を試み、検討した。さらに試験方法の対象として微好気培養を行い成績を比較した。この検討の結果、検体中のカンピロバクターの汚染菌数が多い冷蔵検体では、方法による差が認められなかった。また、菌数が少ないと考えられる冷凍検体は検体数が少なかったため、各試験法の差を明らかにできなかった。

A. 研究目的

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊な培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、モニターを行うことは困難であった。以前の検討から通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、8 箇所の機関で、同一な条件で市販の鶏肉について汚染実態調査を行い、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いた試験方法の妥当性を検証することにした。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部より配布された通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋（A 法、10 袋）および通常のストマッカー袋（B 法、8 袋）に入れられた凍結ボルトン培地を解凍し、添加液を封入した小袋を破壊後、混和し実験に用いた。培養は、通常のインキュベーターを用いた好気培養で行った。試験方法は、分担研究者が示すカンピロバクター試験法を用いた（分担研究報告書参照）。また、試験方法の対象として、自家調製のボルトン培地（Oxoid）と通常のストマッカー袋を用いて微好気培養を行い（C 法、12 袋）成績を比較した。

供試検体は冷蔵で市販されていた7検体の国内産鶏肉(生モモ肉5検体、生ムネ肉2検体)で、表1に示す。内5検体は、冷蔵検体での試験に必要な量を採取後、-30℃で一週間保存して冷凍検体を作製し、試験に供した。

増菌培養は37℃4時間行った後、42℃で20~44時間行い、培養開始から24時間後と48時間後にCCDA培地(Oxoid)とButzler寒天培地(Oxoid)寒天培地に接種し、カンピロバクターの疑われる集落を分離し、性状を確認し同定した。

(倫理面への配慮)
特になし

C. 研究結果 (実験結果には考察を含む)

結果を表2に示した。

冷蔵検体: 検体No.1~5の5検体で3種類の試験方法を検討した。この内No.1、2、5では、24時間増菌→Butzler寒天培地の系で、A、B、Cいずれの試験法でもカンピロバクターを検出した。CCDA培地にはカンピロバクター以外の雑菌の発育が多く、カンピロバクターを検出することができなかった。そして48時間培養ではButzler寒天培地でもカンピロバクター非検出の試験法がみられた。これは、雑菌が多数増殖して、分離平板上でカンピロバクターの集落が確認できなかったためと考えられる。また、検体No.6および7は、C法のみ実施したが、48時間培養でも2つの平板培地に多数のカンピロバクターの発育を認めた。

冷凍検体: 冷蔵検体でカンピロバクターを検出した5検体を冷凍して検討した。検体No.1は3つの試験法のButzler寒天培地を用いた系でカンピロバクターを検出した。検体No.2はB法およびC法でカンピロバクターを検出し、検体No.5は24時間培養ではC法、48時間培

養ではA法のみでカンピロバクターを検出した。冷蔵でもカンピロバクター菌数が少なかった検体No.2および5では、A法、B法の有用性は確認できなかった。

また、検体No.6はA法およびC法を検討し、A法のみでカンピロバクターを検出した。この検体はカンピロバクターの分布に偏りがあつたのではないかと思われる。検体No.7ではA法およびC法のいずれの方法でも多数のカンピロバクターの発育を認めた。

E. 結論

検体中のカンピロバクターの汚染菌数が多い冷蔵検体の24時間培養では、A法およびB法は通常試験法のC法と同じ結果であり、方法による差が認められなかった。

また、菌数少ないと考えられる冷凍検体は検体数が少なかったため、各試験法の差を明らかにできなかった。

そして、カンピロバクター以外の雑菌が多い検体では、CCDA培地に雑菌が多数発育してカンピロバクターの集落が確認できなかったことから、Butzler寒天培地などの選択性が強い分離培地を併用する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. 検体リスト

No.	商品名	購入日
1	若鶏モモ肉（国内産）	2008. 2. 16
2	鹿児島産モモ肉	2008. 2. 17
3	若鶏モモ肉（国内産）	2008. 2. 17
4	鳥取県産若鶏モモ肉	2008. 2. 17
5	宮崎産若鶏モモ肉	2008. 2. 18
6	若鶏ムネ肉（国内産）	2008. 2. 17
7	宮崎産若鶏ムネ肉	2008. 2. 18

①増菌方法

A：配布培地 非通気性袋で好気培養 10袋使用

B：配布培地 通気性袋で好気培養 2袋が解凍中に破れたため8袋使用

C：通常の微好気培養 培地は当所のボルトン培地

検体量は25g、培地量は225mL、培養温度は37℃4時間後42℃20～48時間

②分離培地 CCD AとButzlerを各1枚使用した。

③同定方法 1平板3コロニーずつ釣菌して菌種を同定した。

④追加実験として、増菌培養液からLAMP法でC. jejuniおよびC. coliの検出を試みた。

(当所で開発した方法)

表2. 試験結果 A. 冷蔵検体

検体 No.	増菌 方法	増菌培養24時間 (37°C4時間後42°C20時間)			増菌培養48時間 (37°C4時間後42°C44時間)			参考	
		CCDA Campylobacter 発育	Butzler Campylobacter 発育	菌種	Campylobacter 発育	CCDA Campylobacter 発育	Butzler Campylobacter 発育	菌種	24 h 増 菌培地
1	A	-	++	C. j 3/3	-	++	C. j 3/3	C. j +	C. j +
	B	-	++	C. j 3/3	-	-	-	C. j +	C. j +
	C	-	++	C. j 3/3	-	++	C. j 3/3	C. j +	C. j +
2	A	-	+	C. j 3/3	-	-	-	-	-
	B	-	+	C. j 3/3	-	-	-	-	C. j +
	C	-	++	C. j 3/3	-	+++	C. j 3/3	C. j +	C. j +
3	A	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-
4	A	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-
5	A	-	+	C. j 3/3	-	-	-	-	-
	B	-	+	C. j 3/3	-	-	-	-	-
	C	-	+	C. j 3/3	-	-	-	C. j +	C. j +
6	A	実施せず							
	B	実施せず							
	C	+++	+++	C. j 3/3	+++	+++	C. j 3/3	未実施	C. j +
7	A	実施せず							
	B	実施せず							
	C	+++	+++	C. j 3/3	+++	+++	C. j 3/3	未実施	C. j +

表2. 試験結果 B. 冷凍検体：Aの検体を-30℃で1週間保存したもの

検体 No.	増菌培養24時間 (37℃4時間後42℃20時間)			増菌培養48時間 (37℃4時間後42℃44時間)		
	CCDA Campylobacter 発育	Butzler Campylobacter 発育	菌種	CCDA Campylobacter 発育	Butzler Campylobacter 発育	菌種
1	-	+	C. j 3/3	-	+	C. j 3/3
	-	+	C. j 3/3	-	+	C. j 3/3
	-	+	C. j 3/3	-	+	C. j 3/3
2	-	-		-	-	
	-	+	C. j 1/1	-	-	
	-	+	C. j 3/3	-	+	C. j 2/2
5	-	-		-	+	C. j 3/3
	-	-		-	-	
	-	+	C. j 1/1	-	-	
6	+++	+++	C. j 3/3	+++	+++	C. j 3/3
	実施せず	-		-	-	未実施
	-	-		-	-	
7	+++	+++	C. j 3/3	+++	+++	C. j 3/3
	実施せず	-		-	-	未実施
	+++	+++	C. j 3/3	+++	+++	C. j 3/3

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究
カンピロバクター試験法に関する検討
研究協力者 富永 潔 所属機関 山口県環境保健センター

研究要旨

カンピロバクターの培養では微好気培養が必要であり、食品等を検体とする場合、増菌培養に微好気培養が必要であることから、本菌の食品における汚染を調べることの障害となっている。一方、以前の検討から、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、市販の鶏肉を検体として、このような培養の妥当性を評価することにした。市販鶏肉 10 検体（冷蔵品 5 検体、解凍品 4 検体、凍結品 1 検体）を、それぞれ特殊ストマッカー袋（内気を混合ガスで置換）および通常のストマッカー袋（内気は通常の空気）を用いて好気培養し、カンピロバクターの分離を試み、検討した。（また同時に、標準法である通常のストマッカー袋および自家調製培地を用いた微好気培養による増菌培養も試みた。）この検討の結果、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いた増菌培養は、（冷蔵鶏肉を検体として Butzler 寒天培地を用いて分離培養するという条件下でのみ有用であり、CCDA 寒天培地による分離培養および解凍鶏肉を検体とした場合では有用性がないもの）と思われた。（なお、同時に実施した通常のストマッカー袋を用いた好気培養ではカンピロバクターはほとんど分離できなかったが、標準法である微好気増菌（Preston 使用）では CCDA、Butzler 寒天培地ともに冷蔵鶏肉のほとんどすべてから分離できたことから、CCDA 寒天培地は Preston 増菌では有用であった。しかしながら、今回の検討では、凍結・解凍鶏肉からはいずれの方法でもほとんど分離できなかったことから、損傷を受けた鶏肉からのカンピロバクターの分離は、非常に困難であることが示唆された。）

A. 研究目的

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊な培養装置を必要とすることから、このよ

うな装置が無い場合、モニターを行うことは困難であった。以前の検討から通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の