

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(内部の大気を微好気ガスで置換)及び通常のストマッカー袋(内部の大気は通常の空気)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。あらかじめ滅菌シャーレ内に量り取った25gの鶏肉を、袋のシールの開封を極力狭めながら入れたのちシールし、230rpm30秒間ストマッカー処理し培養は、通常のインキュベーターを用いた好気培養で37℃4時間培養後42℃20時間培養した。この時点で増菌培養液10mlを滅菌遠心管に採取後、再び42℃でさらに24時間増菌培養後、同様に培養液10mlを採取し、それぞれを選択分離培地に1エーゼ面線塗抹して42℃48時間微好気培養し、カンピロバクターと思われるコロニーを3株/検体、純培養して同定した。(対照として冷蔵鶏肉については自家調製のPreston培地を、また凍結・解凍鶏肉については自家調製のBolton培地を用いた。対照の培地は微好気培養により同様に温度シフトを実施して培養)。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・解凍もも肉)を購入し、供試した。

24時間増菌および48時間増菌後、CCDA寒天平板培地およびButzler寒天平板培地に接種し、42℃48時間微好気培養を行い、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)

(実験系Aとして、通気性の無い特殊フィルムを用い微好気ガスで内気を置換したストマッカー袋に入ったBolton培地、実験系Bとして、通常の素材で内気が通常の大気であるストマッカー袋に入ったBolton培地、実験系Cとして、対照として設けた、通常の素材のストマッカー袋に、冷蔵鶏肉については自製Preston、冷凍・解凍鶏肉については自製Bolton培地を入れ、微好気条件下で増菌する、3つの実験系によりそれぞれカンピロバクターの増菌・分離培養を実施し、分離成績を比較検討した。

供試材料の内訳は表1に示すように、No.1~5を冷蔵鶏肉、No.6~10を解凍/凍結鶏肉とし、実験系ごとにA-1~5およびA-6~10というように標記した。表2に示すように、実験系Aでは、24時間・48時間増菌ともに、A-1~5のすべてからカンピロバクターが分離されたが、分離されたのはButzler寒天培地においてのみであり、CCDA寒天培地では、雑菌の増殖が顕著で、これによりカンピロバクターのコロニーは全く確認できなかった。なお、Butzler寒天培地上のコロニー数は増菌時間による増加は認められず、24時間、48時間ともにほぼ同様であった。一方A-6~10から

はカンピロバクターは分離されなかった。

一方実験系 B では、増菌時間、選択分離培地の差にかかわらず、カンピロバクターはほとんど分離できなかった。しかしながら、B-4 の検体だけは、CCDA および Butzler 寒天培地の両方においてカンピロバクターが分離された。また、B-8 からは 48 時間増菌で Butzler 寒天培地のみ少数のカンピロバクターが分離された。

これに対して、実験系 C では、Preston 増菌した C-1~5 では、C-1 を除く 4 検体から、CCDA および Butzler 寒天培地の両方において、極めて多数のカンピロバクターが分離された。しかし、Bolton 増菌した C-6~10 からは、CCDA、Butzler 寒天培地ともに、カンピロバクターは全く分離されなかった。

以上の成績から、以下のように考察された
1 対照である標準培養法(実験系 C)と比較して、特殊素材ストマッカー袋入り・微好気ガス置換 Bolton 培地増菌は、好気条件培養にも拘わらず、冷蔵状態の鶏肉からのカンピロバクター増菌能力が対照に勝っており(対照の分離率 80%に対して、100%)、極めて有用な増菌法と考えられるが、選択力が弱いため、大腸菌と考えられる雑菌の増殖も極めて旺盛となり、選択分離培地として用いた CCDA 寒天培地ではカンピロバクターは分離できなかったことから、この増菌法を用いる場合は、選択分離培地として、選択力の強い Butzler 寒天培地を用いることが必須であると考えられた。

また、Preston 培地増菌を行った標準試験法では CCDA 寒天培地・Butzler 寒天培地の両方においてカンピロバクターが極めて高率に分離されていることから、CCDA 寒天

培地を選択分離培地として用いるためには、Bolton 培地ではなく Preston 培地を、今回の特殊素材ストマッカー袋に入れ、微好気ガス置換して用いることが有用であると推察されたが、検体の状態(菌数が少ない、損傷など)によっては、C-1 のように増菌されない場合も予測される。

2 通常素材ストマッカー袋入り・大気 Bolton 培地は、好気条件下ではカンピロバクターの増菌能力はほとんどないか、あるいは極めて弱く、カンピロバクターの増菌には有用ではないと考えられた。

3 今回の検討においては、対照を含めたすべての増菌方法で、凍結・解凍鶏肉からのカンピロバクターの分離がほとんどできなかったことから、損傷菌の増菌能力が優れていると言われる Bolton 培地を用いても、凍結・解凍鶏肉のカンピロバクターの分離は極めて困難なケースがあることが示唆された。しかしながら、もっと多くの検体について検討すれば、違った結果が得られることも推察される。

E. 結論

(今回の特殊素材ストマッカー袋入り・微好気ガス置換 Bolton 培地増菌は、選択分離培地に Butzler 寒天培地を用いることが必須条件で、しかも冷蔵鶏肉を対象にした場合に、極めてすぐれたカンピロバクター増菌能力を発揮するものと考えられた。)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

表1

試作ボルトン培地入り特殊フィルム素材ストマッカー袋によるCampylobacter増菌能力実験供試鶏肉一覧**山口県環境保健センター**

No.	商品名	購入時の状態	重量	消費期限
1	若鶏もも肉(国内産)	冷蔵	222g	H20年2月14日
2	若鶏小間切れ(国内産)	冷蔵	193g	H20年2月13日
3	親鶏もも肉	冷蔵	248g	H20年2月14日
4	大分産ハーブ鶏もも肉	冷蔵	206g	H20年2月13日
5	国産若どりもも肉	冷蔵	173g	H20年2月13日
6	ブラジル産若鶏もも肉(解凍品)	解凍	493g	H20年2月13日
7	ブラジル産若鶏もも肉(解凍品)	解凍	489g	H20年2月13日
8	若どりチューリップ(手羽先)(解凍品)	解凍	257g	H20年2月13日
9	国産若どりぶつ切り(解凍品)	解凍	162g	H20年2月14日
10	アメリカ産冷凍骨付もも 4本	凍結	1kg	H20年6月26日

表2

試作ボルトン培地による市販鶏肉からのカンピロバクターの検査結果(温度シフトアップあり)
 平成20年2月13日より実験開始
 衛研名: 山口県環境保健センター

a. 冷蔵流通鶏肉25g Bolton(微好気ガス置換 緑印バッグ) X10乳剤

No.	培養温度「シフトあり」							
	24h 培養				48h 培養			
	CCDA		Butzler		CCDA		Butzler	
	Campylo	雑菌	Campylo	雑菌	Campylo	雑菌	Campylo	雑菌
A-1	—	∞	9個	27個	—	∞	30個	30個
A-2	—	∞	9個	40個	—	∞	4個	8個
A-3	—	∞	20個	2個	—	∞	60個	12個
A-4	—	∞	35個	なし	—	∞	30個	2個
A-5	—	∞	8個	3個	—	∞	8個	8個

b. 鶏肉(解凍4検体・冷凍1検体)25g Bolton(微好気ガス置換 緑印バッグ) X10乳剤

No.	培養温度「シフトあり」							
	24h 培養				48h 培養			
	CCDA		Butzler		CCDA		Butzler	
	Campylo	雑菌	Campylo	雑菌	Campylo	雑菌	Campylo	雑菌
A-6	—	—	—	—	—	—	—	∞
A-7	—	—	—	—	—	—	—	50個
A-8	—	9個	—	—	—	—	—	3個
A-9	—	∞	—	8個	—	∞	—	30個
A-10	—	—	—	—	—	∞	—	31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 八尋 俊輔 熊本県保健環境科学研究所
宮坂 次郎 熊本県保健環境科学研究所

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し、カンピロバクターの分離を試み、検討した。また、従来の微好気培養法として、ボルトン培地、プレストン培地を用い、ストマッカー袋の結果と比較した。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、ボルトン培地を用いた従来の微好気培養と同等の分離率を示し、通常のストマッカー袋を用いた方法とプレストン培地を用いた微好気培養より優れていた。よって、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カンピロバクターの培養に有効であることが示された。

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。対照として、自家調整のボルトン培地 (Oxoid)、プレストン培地 (Oxoid) を用いた。ストマッカー袋を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い、自家調整のボルトン培地、プレストン培地を用いた培養は市販のガスパック (BBL CampyPakPlus) を用い、微好気培養した。ストマッカー袋を用いた培養の試験方法は、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)。自家調整のボルトン培地を用いた培養は 37°C 4 時間培養後、42°C で 44 時間培養する温度のシフトアップを行い、プレストン培地の培養は 42°C で 48 時間行った。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 培地 (Oxoid) と Butzler 寒天培地 (Oxoid) 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 1 に示す。検討を行った 10 検体中 6 検体で、いずれかの系列においてカンピロバクターが分離された。生もも肉検体は 5 検体中 4 検体から、冷凍肉では 5 検体中 2 検体からカンピロバクターが分離された。もっとも分離率が高かったのは特殊フィルムを用いた好気培養と自家調整したボルトン培地を用いた微好気培養で、10 検体中 4 検体からカンピロバクターが分離された。通常のストマッカーを用い

た好気培養と、自家調整のプレストン培地を用いた微好気培養は 10 検体中 2 検体からカンピロバクターが分離された。同時に実施したボルトン培地を用いた MPN 法による定量試験では生もも肉 2 検体のみが定量可能であり、その値は 290/100g、230/100g であった。

E. 結論

今回の検討により、10 検体と検体数が少ないが、特殊フィルムを用いた好気培養は、自家調整のボルトン培地を用いた微好気培養と同等の検出率があることが示された。しかし、ボルトン培地を用いた微好気培養に比べ、mCCDA 培地での検出率は低かった。その mCCDA 培地には多数の雑菌 (未同定) が発育しており、増菌培地の選択性は微好気培養に比べ低下していることが示唆された。通常のストマッカー袋の好気培養は、検出率は低く、また mCCDA 寒天培地ではまったく分離できなかった。このことから通常のストマッカー袋による培養はカンピロバクター分離に適さない条件になっていることが示された。

分離培地は Bolton 培地群では Butzler 寒天培地の方が優れていた。Bolton 培地は損傷菌に対応するため Preston 培地より選択性が低いように思われ、そのため mCCDA 培地では雑菌が多数発育する傾向にあると思われた。このことから Bolton 培地で増菌する場合は必ず mCCDA 培地のほかにもう 1 種やや選択性の高い培地を併用し、分離していく必要があると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

表 1 検査結果

検体	特殊フイルムストッカー袋(好気)						通常のストッカー袋(好気)						ホルトン(微好気)						フリストン(微好気)						MPN/100g
	定性結果			定性結果			定性結果			定性結果			定性結果			定性結果									
	mCODA	分離菌	Butzler	分離菌	mCODA	分離菌	Butzler	分離菌	mCODA	分離菌	Butzler	分離菌	mCODA	分離菌	Butzler	分離菌	mCODA	分離菌	Butzler	分離菌					
生もも肉	1	-		+	jeuni	-		-		-		-		-		-		-		-	<30				
	2	+	jeuni	+	jeuni	-		+	jeuni	+	jeunnicoli	+	jeuni	-		-		-		-	290				
	3	-		-		-		-		+	jeuni	+	jeuni	-		-		-		-	<30				
	4	-		+	jeuni	-		-		+	jeuni	+	jeuni	-		-		-		-	230				
	5	-		-		-		-		-		-		-		-		-		-	<30				
生肉検出率(%)	20		60		0		20		60		0		0		0		40		40						
冷凍肉	1	-		+	coli	-		+	coli	-		+	coli	+	coli	+	coli	+	coli	+	<30				
	2	-		-		-		-		-		-		-		-		-		-	<30				
	3	-		-		-		-		-		-		-		-		-		-	<30				
	4	-		-		-		-		-		-		-		-		-		-	<30				
	5	-		-		-		-		-		-		+	coli	+	coli	+	coli	+	<30				
冷凍肉検出率(%)	0		20		0		20		20		0		40		40		40		40						
全体検出率(%)	10		40		0		20		30		40		20		20		20		20						

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 横山敬子, 高橋正樹, 甲斐明美,

所属機関 東京都健康安全研究センター

研究要旨

カンピロバクターの培養では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、冷凍各 5 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。対照として、自家調製したボルトン、プレストン増菌培地で好気培養を行った。市販鶏肉 10 検体中 1 検体から *C. jejuni* が検出された。増菌方法は、特殊ストマッカー袋を用いたものであった。しかし、鶏肉の汚染菌量が少ないと推察され、この陽性結果が検査法によるものか、鶏肉の汚染部位差によるものか不明であり、さらに検討が必要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、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）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（B法：10袋）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42℃好気培養で行った。また、対照として自家調製のボルトン培地（C法：10袋）、及びプレストン培地（D法：10袋）で微好気培養を実施した。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）。市販鶏肉10検体（冷蔵鶏肉：5検体、凍結鶏肉：5検体）を購入し、供試した。増菌後、CCDA及び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

結果を表に示した。

冷蔵鶏肉：検体 No. 1～5 の内、No. 5 の検体においてA法による24及び48時間培養でCCDA、Butzler寒天平板から*C. jejuni*を検出した。

B法では、選択分離平板上にカンピロバクターの疑われる集落が検出されたが、同定の結果*Helicobacter*属菌であった。C、Dの自家調製した増菌培地からは検出されなかった。

冷凍鶏肉：検体 No. 6～10 の検査を実施したところ24時間の増菌培養では何れの方法からもカンピロバクターは検出されなかった。48時間培養では検体 No. 7 のA法-CCDA、B法-CCDAにおいてカンピロバクターの疑われる集落が検出されたが、同定の結果*Helicobacter*属菌であった。

市販鶏肉10検体中1検体から*C. jejuni*が検出された。増菌方法は、特殊ストマッカー

袋を用いたものであった。しかし、鶏肉の汚染菌量が少ないと推察され、この陽性結果が検査法によるものか、鶏肉の汚染部位差によるものか不明であり、さらに検討が必要であることが示唆された。

E. 結論

今回の結果では、陽性検体が冷蔵鶏肉1検体のみで、本来冷凍鶏肉に付着している損傷菌を目的としたボルトン培地の有効性を評価することは困難であった。

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. 鶏肉からのカンピロバクター分離方法の比較検討結果

増菌培養条件 (42°C 24時間)

	No.	A法: Bolton(緑印) (特殊フィルム)		B法: Bolton (微好気ガス充填)		C法: Bolton (自家調製)		D法Preston (自家調製)	
		CCDA	Butzler	CCDA	Butzler	CCDA	Butzler	CCDA	Butzler
国産鶏肉 (冷蔵)	1	-	-	-	-	-	-	-	-/+++
	2	-	-	-	-	-	-	-/+++	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-
		Cjejuni	Cjejuni	Helicobacter					
輸入鶏肉 (冷蔵)	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-/+++	-

増菌培養条件 (42°C 48時間)

	No.	A法: Bolton(緑印) (特殊フィルム)		B法: Bolton (微好気ガス充填)		C法: Bolton (自家調製)		D法Preston (自家調製)	
		CCDA	Butzler	CCDA	Butzler	CCDA	Butzler	CCDA	Butzler
国産鶏肉 (冷蔵)	1	-	-	-/+++	-/+++	-	-	-	-/+++
	2	-	-	-	-	-	-	-/+++	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-/+++	-/+	-	-	-/+++	-/+++
	5	+	+	+	-	-	-	-	-
		Cjejuni	Cjejuni	Helicobacter					
輸入鶏肉 (冷蔵)	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	+	-	+	-	-	-	-/+++	-
		Helicobacter		Helicobacter					
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-/+++	

供試鶏肉

- 1 国産 モモ肉
- 2 岩手県産 モモ肉
- 3 国産 ムネ肉
- 4 岩手県産 モモ肉
- 5 岩手県産 ムネ肉
- 6 輸入冷凍鶏肉
- 7 輸入冷凍鶏肉
- 8 輸入冷凍鶏肉
- 9 輸入冷凍鶏肉
- 10 輸入冷凍鶏肉