

バイオフィルム採集箇所

図8 各バイオフィルムの無添加および0.1% Tween 添加希釈液における一般生菌数

平成 21 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）
（分担研究報告書）

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

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食中毒起因菌であるカンピロバクター・ジェジュニ／コリの試験では微好気培養を必要とし、食品を検体とする試験においても、特殊な装置を用いた微好気培養を行わなければならない。このことが食品における本菌の試験を一般の試験室で行う場合の障害となっている。一方、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と、通常の好気培養用のインキュベーターで本菌の増菌培養が可能であること平成 19 年度の本研究班の検討で示した。行程管理の試験などに適する方法と思われるが、このような培養方法を広く用いるためには、基準となる標準試験法と同等ないしはそれ以上の検出が可能であることは重要で、試験法の妥当性確認の手順により評価することが必須である。一方、我が国にはカンピロバクターの微生物規格がないため、公定法はない。そこで地方衛生研究所 9 機関との共同研究を行い、国際的な標準法である ISO 法を基に、標準試験法の作成を進めた。昨年度は冷蔵肉でプレコロボ試験をおこない、本年度は冷凍鶏肉を用いて、研究室間共同試験により試験法案の妥当性確認を試みた。鶏肉に人工的に菌株を接種した検体を共同研究者に送付し、各機関で試験を行いその結果を集計、評価した。増菌培地については、ISO 法で用いられているボルトン培地と、これまで国内で一般的に用いられてきたプレストン培地の性能比較を行った。選択寒天平板培地は、mCCDA 培地とバツラー培地について評価した。今回の研究室間共同試験により、プレストン培地での増菌の方がボルトン培地での増菌に比べ検出率が高いこと、ボルトン培地で増菌した場合は、mCCDA 培地でのカンピロバクターの分離は困難であり、選択平板培地はより選択力の強いバツラー培地を用いないと分離率が極端に低下することが明らかとなった。さらに、ボルトン培地と mCCDA 培地の組み合わせで、カンピロバクター以外の集落が多数みられたが、これらの多くが近年急速に増えている拡張型 β ラクターマーゼ産生菌（ESBL）であることを明らかにした。国際的な標準法である ISO 法は、近年の鶏肉での ESBL の急激な増加により分離能が低下しており、速やかに試験法を再考しこの対策を立てる必要性があることを示した。

研究協力者

門田修子	国立医薬品食品衛生研究所
加藤光徳	同上
岡田由美子	同上
齊藤志保子	秋田県健康環境センター
藤田雅弘	群馬県衛生環境研究所
小野一晃	埼玉県衛生研究所
甲斐明美	東京都健康安全研究センター
横山敬子	同上
平松礼司	愛知県衛生研究所
田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
石村勝之	広島市衛生研究所
富永潔	山口県環境保健センター
八尋俊輔	熊本県保健環境科学研究所
宮坂次郎	同上
吉田朋高	食品分析開発センターSUNATEC
松岡英明	東京農工大学
久保 亮一	関東化学株式会社
中野 倫太	同上
戸田 政一	同上

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、食品における本菌の汚染を調べることは困難であった。さらにカンピロバクターは、酸素や乾燥ストレスに弱いため、食品検査に於いて試験法が異なると検出結果が大幅に異なってしまう。国内にはカンピロバクターの微生物基準はなく、公定法がないため、統一した試験法での汚染実態調査は行われていない。試験法を検討するためには、基準とな

る試験法の確立が必須である。平成19年度の当研究班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。この方法は広く汚染実態を調査する目的にはたいへん有用であると思われる。この方法が試験法としてどの程度の信頼性を持つかあるいは、今後国際的に広く認められる方法であるか判断するためには、基準となる標準試験法と科学的根拠のあるバリデーション(妥当性確認)を行わなくてはならない。基準となる試験法(ISO法など)をプロトコール化し、標準試験法を確定し、その上で今回開発した新しい試験方法の正当性を評価することが必要である。研究班ではISO法を基に検討を進め、標準試験法案を作成し、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”で作業部会案として認められたことから、菌株を人工的に接種した鶏肉について、9箇所の機関で研究室間共同試験を行った。その結果を解析し、広く用いることのできるカンピロバクター標準試験法の作成を進めた。

B. 研究方法

あらかじめ25gずつ鶏挽肉をストマッカー袋に計量し、人工的に菌株を接種した検体を、共同研究者に送付し、カンピロバクター標準試験法作業部会案に従い、試験を実行した。試験は、国立医薬品食品衛生研究所がweb上で公開している“食品からのカンピロバクター(ジェジュニ/コリ)の試験法案(ステージ2:作業部会案)NIHSJ-02-ST2”に従って実施した。昨

年度は、冷蔵肉について検討をおこなったので、本年度は冷凍鶏肉を対象として検討をおこなった。

研究室間共同試験の規模は、9 試験所で、陽性試料 2 濃度各 3 回反復、陰性試料 3 回反復で行った。陽性試料は高濃度接種群 3、低濃度接種群 3、非接種群 3 の合計 9 を、増菌培地 2 種類で行うこととし、計 18 試料を配布した。各機関の試験結果を収集し、定性試験法の評価法に従い評価し、2 種類の増菌培地の比較と、選択寒天平板培地との組み合わせについて評価した。増菌培地は ISO 法で用いられているボルトン培地と、これまで国内で一般的に用いられてきたプレストン培地の性能比較を行った。

選択培地上に増殖した集落を純粋培養し、菌種を調べると共に、抗菌剤の耐性獲得状況などその性質を明らかにした。

(倫理面への配慮)

本研究は問題になる研究内容を含まない。

C. 研究結果

鶏挽肉を 25g ずつ取り分けた後、定めた菌数のカンピロバクターを接種し、検体を凍結した。菌株接種前に、鶏挽肉は 2 回の凍結融解により、自然汚染と思われるカンピロバクターの影響は抑えられたが、一部の非接種群の検体から、残存と思われるカンピロバクターが分離された。非接種群からの分離は血清型別により接種菌でないことを確認可能である。

それぞれの協力研究者の判定結果を資料として報告書に添付した。今回配布した試料の共雑菌のレベルは高く、選択能の低い選択寒天平板培地上では、共雑菌が覆うように増殖し、カ

ンピロバクターの有無の判定の出来ない培地も見られた。特にボルトン増菌したのち、mCCDA に接種した場合、ほとんどの平板上にカンピロバクター以外の集落の形成が見られた。選択増菌培地と選択寒天平板培地の組み合わせによっては、カンピロバクターの分離は可能であった。

9 箇所で得られたデータの形式を統一して結果を集計したものを集計表として示した。この集計表を基に、それぞれの培地の性能に関する考察を試みた。ボルトン培地で増菌したのち、mCCDA 培地で分離を行うと、共雑菌が多くカンピロバクターが分離できないことが示された。

選択培地上に増殖した集落を純粋培養し、菌種を調べたところ、大腸菌およびクレブシエラであった。抗菌剤の耐性獲得状況などからそれらはいずれも、拡張型 β ラクタマーゼ産生菌 (ESBL) であることがわかった。

D. 考察

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、食品における本菌の汚染を調べることは困難であった。平成 19 年度は特殊な機械を必要としないで、通常のインキュベーターを用いてカンピロバクターの増菌が出来ると思われる新たな培養法として、特殊ストマッカー袋による培養を検証した。その結果、新たな方法は実効性が高い培養法であることが示された。

研究班の開発した方法を広く用いるとすると、国際的に用いられている ISO 法との比較に於いてどの程度の感度や精度で試験を行うこ

とが可能であるかを、国際的に通用する評価法で妥当性確認する必要がある。国内では、カンピロバクター試験法の公定法がないため、厚労科研費の“食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究” 研究班が行っている標準試験法検討委員会に、カンピロバクター標準試験法の提案を行い、ISO 法に準じた標準試験法の提案を行った。委員会で作業部会案として認められた試験法を用い、カンピロバクター試験法の妥当性確認を進めた。

カンピロバクターでは、菌が非常に死にやすいため、菌の添加・回収実験が可能であるかも不明である。培養した菌液を2濃度設定し、各協力研究者に配布した場合、実際に菌が回収可能であるかを、n=3 で評価した。

供試菌接種前に鶏挽肉を2回凍結融解することにより、自然汚染と思われるカンピロバクターの影響は抑えられたが、一部の非接種群の検体から、残存と思われるカンピロバクターが分離されてしまった。このことから、自然汚染の疑いのある鶏肉からのカンピロバクターの完全な排除は技術的に難しく、今後の評価ではあらかじめカンピロバクターのコンタミのレベルの低い鶏肉を選ぶ必要がある。そうすれば実用レベルの検討は可能である。本年度は昨年度に比べてこの点が大きく改善し、非接種群からの自然汚染によるカンピロバクター検出は最小限に抑えられたといえる。

今回の添加回収実験は、実際の標準試験法を妥当性確認するためのプレラボ試験に相当する。これまでの共同研究と今回のプレラボにより、明らかにされた項目は以下の項目である。

①市販の鶏肉にはこれまでの検討で、約7～8割程度の確率で自然汚染のカンピロバク

ターが存在するため、挽肉とした後、凍結融解を繰り返しカンピロバクターの検出を試験に影響を与えないレベルに低下させ、かつ鶏肉の正常菌叢をできるだけ維持することができることを実証した。

②鶏肉に接種したカンピロバクター菌株が、低温、あるいは凍結で保存した場合、どの期間菌数を保てるかの知見を得た。

③人口接種された菌株は、検体輸送中に生存し、菌数を維持できるかについて知見を得た。

④コラボスタディが行える程度に菌数変化のレベルが抑えられるか知見を得た。

⑤ボルトン培地とプレストン培地という2種類の選択増菌培地の性能がどの程度異なるかの基礎データを得た。

⑥それぞれの選択増菌培地から、分離寒天平板培地に接種した場合、カンピロバクターの分離が可能であるかの基礎データを得た。

⑦選択増菌培地と分離寒天平板培地の組み合わせの優劣があるかの基礎データを得た。

⑧鶏肉のカンピロバクター分離に適する選択増菌培地と分離寒天平板培地の組み合わせはどれかに関する基礎データを得た。

⑨このシステムがコラボ試験に耐えるかどうか評価することが出来た。

以上から、カンピロバクターの標準試験法の“コラボ案”を作成し標準試験法検討委員会へ提案した(別添)。

鶏肉から分離された共雑菌の検討から、これらの菌は、拡張型βラクタマーゼ産生菌(ESBL)であり、近年鶏肉汚染が急速に広まっているようである。国際標準法であるISO法では、カンピロバクターの増菌培地にボルトン培地、選択培地にmCCDAを指定している。この組み合わせであるといずれもβラクタム系抗菌剤を利用

していることからカンピロバクターの分離に差し支えると思われた。今回の成績でも、この組み合わせではほぼ全ての mCCDA 平板培地上に共雑菌の集落が観察されている。選択平板培地としてバツラーなど他の選択剤を用いている培地を併用することが重要である。

E. 結論

今回行ったカンピロバクター標準試験法の作業部会案の研究室間共同試験により、カンピロバクターの妥当性確認を行うための基礎的なデータおよび、コラボ案決定に必要な基礎的なデータを得ることが出来た。この検討により標準試験法のコラボ案を作成した。今後は、今回の検討に基づき、最終コラボを実施し、標準試験法を作成すると共に、研究班が作成した特殊ストマッカー袋を用いた試験法の妥当性確認を行うことが、可能となった。

現在の国際標準法である ISO 法は、鶏肉への ESBL の急速な汚染拡大により、検出能力が低下しつつあり、早急な見直しが必要と思われる。

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

- ① Igimi, S., Ishiwa, A.*1, Yamasaki, M.*2, Okada, Y., Monden, S., Asakura, H., Yamamoto, S. Antimicrobial resistance and genotyping of the pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* isolated from bovine and poultry. 15th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and related Organisms (2009.9) (Niigata)
- ② Igimi S. Progress for setting up “Standard method” of “Committee to set up Standard method for food microbiology” in Japan. Workshop for method validation for food microbiology. 日本食品微生物学会(2009.10)
- ③ 五十君静信。カンピロバクターによる食中毒について。食品の安全・安心に関するリスクコミュニケーション。(2010.1)千葉市

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

カンピロバクター標準試験法確立のためのプレラボ実験 2 (凍結検体) プロトコール

1. プレラボ試験の目的

近年カンピロバクターによる食中毒が問題となっているが、現在のところカンピロバクターの試験法は確立されていない。実際にどの程度の食品がカンピロバクターに汚染されているのかを示すために、信頼性の高い試験法が必要とされている。このことから鶏肉におけるカンピロバクター（ジェジュニ/コリ）の試験法を確立することを目的とする。

今回は第 2 回プレラボ実験として、カンピロバクター・ジェジュニ 1 株を用いて、凍結検体を対象に実験を行う。市販の鶏肉に予め菌量の分かっているジェジュニ（①多い、②少ない、③なし）を接種した検体を 18 個送付します。各群の（①多い、②少ない、③なし、それぞれ $n=3$ ）をスパイクしたものを、2 種類の増菌培地（プレストンとボルトン）で増菌します。さらに増菌後それぞれを 2 種類の分離培地（CCDA とバツラー）を用いてその培地の有効性を検討します。また、本実験により、冷凍検体でカンピロバクターの接種回収実験が可能であるかの検証も行います。前回のプレラボ実験と異なる点は、検体が乱数で番号化してある（情報は提供します）こと、培養温度は ISO に従い $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、増菌培地量 225ml、増菌後の選択平板培地への接種は $10\mu\text{l}\times 2$ 枚で行っていただきたい。尚、増菌前の選択平板培地への接種は、前回同様 $100\mu\text{l}$ 、 10μ 各 1 枚で前回と同様です（フロー図参照）。

2. 国立医薬品食品衛生研究所からの発送まで

I サンプルの調整

ストマック袋：市販の通気性を考慮されていない通常のストマック袋を用いる。

検体となる鶏肉：市販の鶏のミンチ肉を用いる。ミンチ肉は凍結融解を 2 回繰り返し、カンピロバクターの自然汚染レベルを下げ、凍結で保管し、菌を接種後、凍結状態で送付し、試験機関にて解凍後実験に用いる。

使用菌株：カンピロバクター・ジェジュニ NCTC11168

保護剤：Maximum Recovery Diluent (Oxoid) に菌体をけん濁し、スパイクする。

II サンプルの郵送

冷凍：1 機関に対して 18 サンプルを準備し、ドライアイスで-20℃以下に保って輸送する。

III 検体の識別

プレラボ実験でスケールダウンしておりますので、プレストン、ボルトン増菌を 3 検体ずつ行っていただきたいと思います。今回の検体は乱数で調整してしまいましたので、接種菌数対照表を別添します。お手数ですが各自検体番号を確認していただき、各グループの若い番号から 3 検体をプレストンに、残り 3 検体をボルトン培地にて増菌してください。

IV 検体送付先

秋田県健康環境センター	齋藤志保子
埼玉県衛生研究所	小野一晃
東京都健康安全研究センター	横山敬子
群馬県衛生環境研究所	藤田雅弘
愛知県衛生研究所	平松礼司
大阪府立公衆衛生研究所	川津健太郎
広島市衛生研究所	石村勝之
山口県環境保護センター	富永潔
熊本県保険環境科学研究所	八尋俊輔
国立医薬品食品衛生研究所	五十君静信

V 培地、検体などの郵送

プレストン、ボルトンの市販の粉末培地、バツラー、CCDA の生培地を購入し、必要な分を各研究機関に郵送する。(11 月 24 日頃発送の予定)

検体は、11 月 25 日に郵便にて発送の予定ですので、26 日または 27 日に到着すると思います。検体は到着後、速やかに開梱し、試験開始まで-20℃以下のフリーザーで、温度ロガーと共に保管してください。

3. 各機関で行うこと

(1) 増菌培地の準備とサンプルの調整：試験に先立ち増菌培地（プレストン及びボルトン）培地を作成し、準備する。

(2) 検体が到着しましたら、速やかに開梱し-20℃以下の温度となるようフリーザーに移し、試験開始まで保存する。

(3) 検体の番号を確認し、検体番号を接種菌数対照表と照合し、どの検体をどの増菌培地で増菌するか確認する。検体は解凍後、それぞれの増菌培地 225ml を加えて、ストマッカーにてホモジネートする。

(4) 検体の初期菌数を確認するため、上記 10%乳剤の 10 μ l、100 μ l を 2 種の選択平板培地に各 1 枚ずつ接種し、培養し発育したコロニー数を計数記録する。

(3) プレストンの場合は微好気条件下にて 37 \pm 1 $^{\circ}$ Cにて4時間培養後に、42 \pm 1 $^{\circ}$ Cにて 24-44 時間培養する。24、44 時間後に選択培地に接種。ポルトンの場合は微好気条件下にて 42 \pm 1 $^{\circ}$ Cにて 24-48 時間培養する。24、48 時間後に選択培地に接種。微好気条件は各機関により異なる(①または②)。

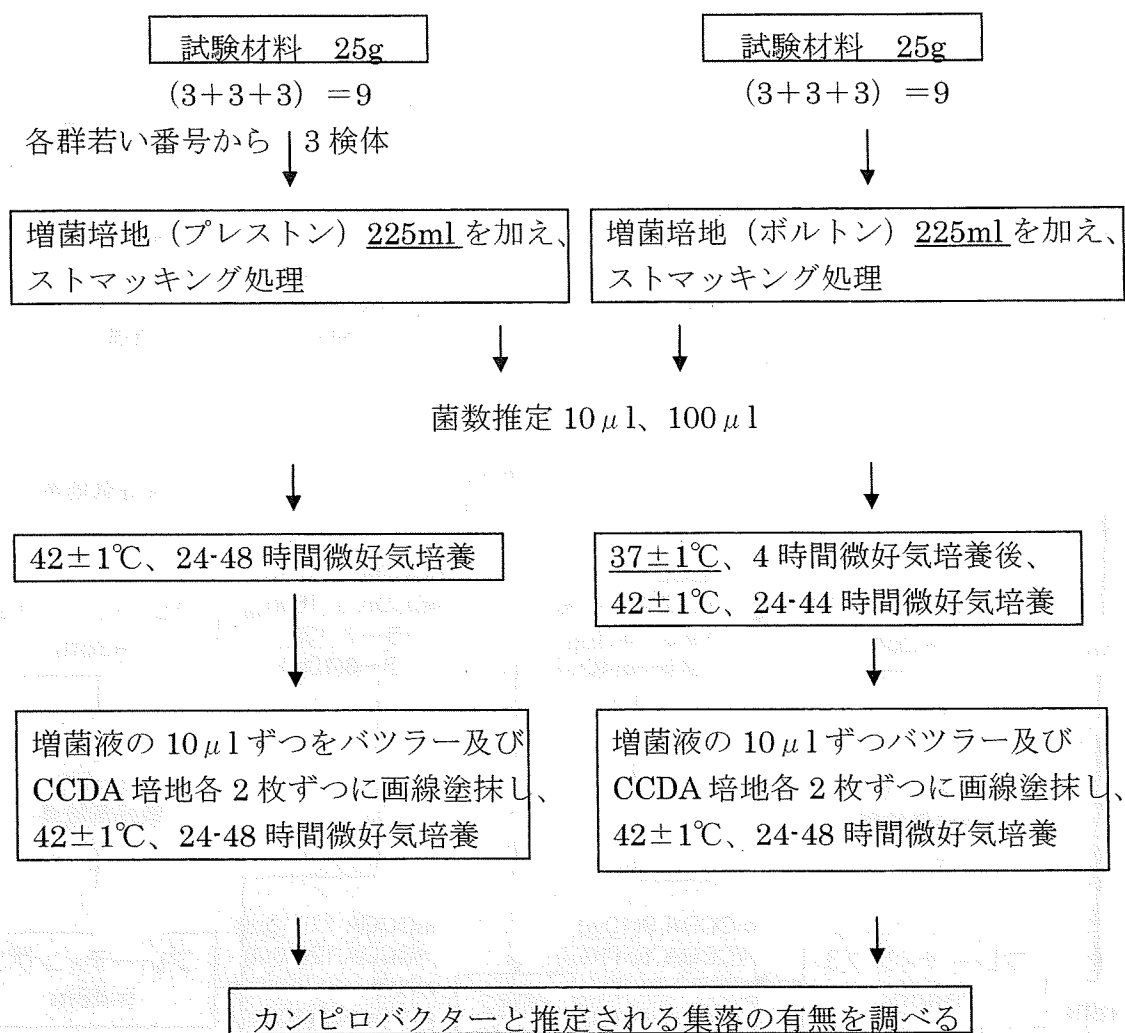
①微好気ガスの組成の条件を維持できるもの

②市販の微好気ジャーシシステム(ガスキットシステムなど)を利用する。

(4) 増菌培養した乳剤を分離培養分離培地(バツラーおよび CCDA、各 2 枚)に 10 μ l ずつ画線塗抹し、42 \pm 1 $^{\circ}$ Cにて 24-48 時間培養する。(1 日後、2 日後に同様に接種)

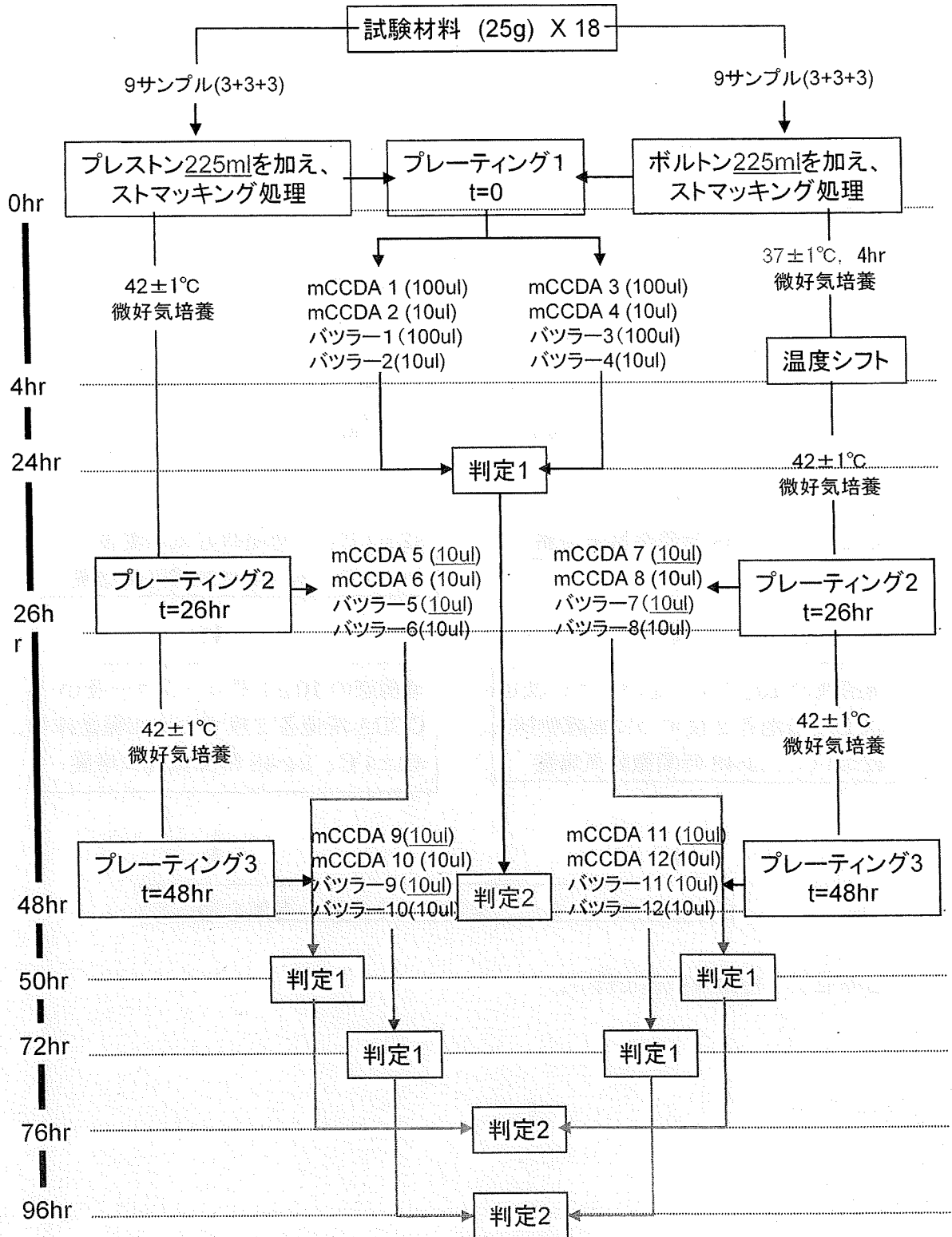
(5) 成育したコロニーの形態観察を行い、カンピロバクターと思われるコロニーの有無を調べる。

カンピロバクターの試験法



このセットを冷凍検体で行う。

カンピロバクタープレコラボ実験2の実施フロー図



プレコロボ2：冷凍鶏肉での添加回収実験集計

N=30 (濃度別;3検体*10機関*1連) * 2連の+/- or -/+ を+にして計測

Campylobacter jejuni

	ボルトン				プレストン			
	mCCDA		バター		mCCDA		バター	
	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h
高濃度群	12	10	29	29	29	29	30	28
低濃度群	9	8	27	28	28	28	30	29
非接種群	1	1	1	1	3	3	3	3

N=60 (濃度別;3検体*10機関*2連)

Campylobacter jejuni

	ボルトン				プレストン			
	mCCDA		バター		mCCDA		バター	
	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h
高濃度群	24	18	58	58	58	58	60	56
低濃度群	17	14	54	54	56	56	60	58
非接種群	2	1	2	2	6	6	6	6

共雑菌

	ボルトン				プレストン			
	mCCDA		バター		mCCDA		バター	
	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h	t=24h	t=48h
高濃度群	48	50	32	37	2	4	3	10
低濃度群	48	54	34	43	8	12	4	22
非接種群	52	54	36	44	1	4	2	8

Preston増菌培地による試験結果

培養時間 判定時間	26hr		24hr		48hr		48hr		48hr	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
非接種	mCCDA(100ul)	3	27	90.0%	3	27	90.0%	3	27	90.0%
	mCCDA (10ul)	3	27	90.0%	3	27	90.0%	3	27	90.0%
	バツラー-(100ul)	3	27	90.0%	3	27	90.0%	3	27	90.0%
	バツラー-(10ul)	3	27	90.0%	3	27	90.0%	3	27	90.0%
低濃度	mCCDA(100ul)	28	2	93.3%	28	2	93.3%	28	2	93.3%
	mCCDA (10ul)	28	2	93.3%	28	2	93.3%	28	2	93.3%
	バツラー-(100ul)	30	0	100.0%	30	0	100.0%	28	2	96.7%
	バツラー-(10ul)	30	0	100.0%	30	0	100.0%	28	2	96.7%
高濃度	mCCDA(100ul)	29	1	96.7%	29	1	96.7%	29	1	96.7%
	mCCDA (10ul)	29	1	96.7%	29	1	96.7%	29	1	96.7%
	バツラー-(100ul)	30	0	100.0%	30	0	100.0%	28	2	93.3%
	バツラー-(10ul)	30	0	100.0%	30	0	100.0%	28	2	93.3%

Bolton増菌培地による試験結果

培養時間 判定時間	26hr		24hr		48hr		48hr		48hr				
	陽性	陰性	正答率	陽性	陰性	正答率	陽性	陰性	正答率	陽性	陰性	正答率	
非接種	mCCDA(100ul)	1	26	96.3%	1	26	96.3%	1	26	96.3%	1	26	96.3%
	mCCDA (10ul)	1	26	96.3%	1	26	96.3%	0	27	100.0%	0	27	100.0%
	バツラー-(100ul)	1	26	96.3%	1	26	96.3%	1	26	96.3%	1	26	96.3%
	バツラー-(10ul)	1	26	96.3%	1	25	92.6%	1	26	96.3%	1	26	96.3%
低濃度	mCCDA(100ul)	6	21	22.2%	8	19	29.6%	5	22	18.5%	7	20	25.9%
	mCCDA (10ul)	6	21	22.2%	7	20	25.9%	6	21	22.2%	7	20	25.9%
	バツラー-(100ul)	27	0	100.0%	27	0	100.0%	24	3	88.9%	26	1	96.3%
	バツラー-(10ul)	27	0	100.0%	27	0	100.0%	25	2	92.6%	26	1	96.3%
高濃度	mCCDA(100ul)	10	17	37.0%	11	16	40.7%	8	19	29.6%	10	17	37.0%
	mCCDA (10ul)	9	18	33.3%	13	14	48.1%	7	20	25.9%	8	19	29.6%
	バツラー-(100ul)	27	0	100.0%	27	0	100.0%	26	1	96.3%	27	0	100.0%
	バツラー-(10ul)	27	0	100.0%	27	0	100.0%	27	0	100.0%	27	0	100.0%

カンピロバクター（ジェジュニ/コリ）試験法
コラボスタディ実行案（ステージ3：コラボ案）

NIHSJ-02-ST3

増菌培養法

1. コラボ試験の目的

食品流通のグローバル化にある現状を背景として、国際的に互換性のある試験を行うことは重要であり、このような観点からわが国における食品微生物試験法の見直しを行い、信頼性の高い試験法について検討を行ってきた。本コラボ試験においては、カンピロバクター（ジェジュニ/コリ）試験法について検証を行うことを目的とする。本試験においては以下の再現性を確認することを目的とする。

- ①室内再現性（Repeatability）
- ②室間再現性（Reproducibility）

2. 参考引用規格

国際的に通用する検証を実施するために、妥当性確認の国際規格である ISO16140 に準拠し、また、ISO の考え方を取り入れている AOAC 法のコラボレートスタディーの実施例を参照し実行する。

3. 実施予定試験所数

12ヶ所程度で実施予定

4. 試験方法

以下の試験法について、使用培地等試験法詳細を特定して試験を行い、それぞれの妥当性を検証する。

増菌培養法における試験法

5. 試験検体

本試験において、SIC コードに基づき、どのカテゴリーに対して検証するか決定する。カンピロバクター（ジェジュニ/コリ）による危害の可能性が高い食材として、食品検体は鶏肉 1 種類につき行う。

6. 試験菌株

本試験では 1 種類の菌株を使用する。

7. 菌接種試料の調製

スパイクによる 2 段階の菌量レベルを検討する。菌液濃度は

- ① 1000-9999 CFU/g × 8 サンプル
- ② 10-99 CFU/g × 8 サンプル
- ③ 非スパイク試料 × 8 サンプル

8. 試料の輸送

検体はドライアイスで凍結状態に保って輸送し、各試験室に到着後は試験開始まで-20℃以下で凍結保存。温度履歴をとる。

9. 試験

別添のプロトコールによる。増菌は Preston 培地と Bolton 培地を併用する。

分離平板培地は、mCCDA 寒天平板培地、Butzler 寒天平板培地を用いる。

試験は、試料が到着後、速やかに開始する。

10. 試験試料の処理方法

- ① 試料の包装表面をアルコール綿で拭く。
 - ② 滅菌したピンセット、ハサミを用い、包装を開く。
 - ③ 試料 25g をストマッカー袋に入れる。(コラボでは検体を凍結状態で配布)
 - ④ 希釈液 90 ml を加え、1 分間ストマッキングして、10 倍乳剤とする。
- 注：コラボでは、試料をストマッカー袋で配布予定のため、①～③は省略

11. 結果の提示

試験結果は、増菌培養法におけるカンピロバクターの有無を示し、生データと共に解析担当者に提出する。記録用紙書式は配布の予定。

12. 統計

すべての生データを、解析担当者が集め、統計解析を行う。

別添. カンピロバクター・ジェジュニ／コリ試験法・増菌培養法

(ステージ3:コラボ案)NIHSJ-02-ST3

1. カンピロバクター・ジェジュニ／コリの定義

本試験法でいうカンピロバクター・ジェジュニ／コリは、微好気培養条件下で $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で選択培地上に定型的あるいは非定型的な発育集落を示すが、 25°C では増殖しないカンピロバクター属菌で、本試験法で示す生化学性状の特徴を持つ菌とする。

2. 試験の概要

本試験は、鶏肉中にカンピロバクター・ジェジュニ／コリが存在するかを、増菌培地で増菌培養した後、選択平板培地に接種し、集落が観察されるかを調べる定性試験である。試験法は2種類の増菌培地ボルトン培地とプレストン培地、選択分離培地としてmCCDA寒天平板培地、Butzler培地を用いる。なお、ISO10272では、カンピロバクターの増菌培地としてボルトン培地のみを使用し、選択培地としてmCCDA及び他の選択培地を組み合わせ試験するとなっている。作業部会での2度のプレコラボ試験の結果では、ボルトン培地とmCCDA培地の組み合わせの試験結果が思わしくないため、増菌培地としてプレストン培地、も加えて検討し、標準試験法の検討のためのデータを提供するものとする。疑わしい集落は、純培養を行った後、性状を確認し同定する。

3. 使用機器、器具

- ① 乾熱滅菌器、オートクレーブ
- ② ふらん器 ($41.5 \pm 1^\circ\text{C}$)
- ③ 微好気用孵卵器、または微好気用培養用ジャー
- ④ 寒天平板用乾燥器あるいはふらん器 ($25 \sim 50^\circ\text{C}$)
- ⑤ pHメーター
- ⑥ 天秤
- ⑦ メスシリンダー
- ⑧ 除菌フィルター ($0.22 \mu\text{m}$)
- ⑨ ストマッカー、ストマッカー袋
- ⑩ 滅菌ハサミ、ピンセット
- ⑪ 試験管 (小、中)、試験管立て
- ⑫ 三角フラスコ
- ⑬ 滅菌シャーレ (90 mm)
- ⑭ 白金耳、パストゥールピペット

- ⑮ 滅菌ピペット (1、2、10 ml)
- ⑯ 滅菌コンラージ棒 (スプレッダー)

4. 増菌培養法

4-1 検体の調製

検体 25 g をハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取する。ストマッカー一袋に入れ、増菌培地 100ml を加え、1 分間ストマッキング処理を行う。増菌培養は、プレストン(Preston)培地を利用する。また、菌損傷の可能性の高い場合は ボルトン(Bolton)培地を使用する。

4-2 選択増菌培地による増菌

4-2-1 ボルトン培地

微好気条件下にて $35 \pm 1^\circ \text{C}$ にて 4 時間培養の後に、 $42 \pm 1^\circ \text{C}$ にて 24・44 時間培養する。尚、温度シフトを行わないで $42 \pm 1^\circ \text{C}$ で培養することも可能である。

4-2-2 プレストン培地

微好気条件下にて $42 \pm 1^\circ \text{C}$ にて 24・48 時間培養する。

4-2-3 微好気条件の設定

微好気条件とは酸素 5%、二酸化炭素ガス 10%、チッ素 85%を基本とする。

- ① 培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータを使用する。
- ② 市販の微好気ジャーシステム (ガスキットシステムなど) を利用する。
- ③ 微好気ガスで容器の気相を置換し、ガスを透過しない容器で密閉する。
- ④ 通気性のない材質の容器または袋を使用し、これに増菌培養液を直接入れた後、上部空隙部分を少なくして密閉する。

4-3 分離培養

分離培地に増菌培養した液を画線塗抹し、 $42 \pm 1^\circ \text{C}$ にて 24・48 時間培養する。分離培地は mCCDA 培地を用いる。また、必要に応じて、下記の培地を追加する。必要に応じ追加する培地: Butzler 培地, Preston 寒天培地, Karmali 寒天培地, Modified Skirrow 培地, 培養液は油層を出来る限り避けて採取し、分離培地に塗抹する。

4-4 確認試験

4-3-1 純培養

選択分離培地上に発育した直径 1 - 2 mm 程度の正円形でやや隆起したコロニー（時に扁平する）で、カンピロバクターを疑う集落を 1 平板につき 2 ~ 5 個釣菌し、血液寒天培地およびこれと同等の糖の含有が少ない非選択培地に塗抹して $42 \pm 1^\circ\text{C}$ にて 24 - 48 時間培養する。

4-3-2 同定

4-3-2-1 グラム染色

常法に従う。菌形の確認：ラセン状（球状 [コッコイド] の場合もある）のグラム陰性かん菌

4-3-2-2 カタラーゼ

陽性

4-3-2-3 オキシダーゼ

陽性

4-3-2-4 ラテックス凝集テスト (DrySpotTest など)

陽性

4-3-2-5 必要に応じて TSI 培地などで生化学試験

4-3-2-6 菌種を決定する場合は、以下を追加して行う

- ① 馬尿酸塩加水分解試験 (*C. jejuni* [+], *C. coli* [-])
- ② インドキシル酢酸塩加水分解陽性 (*C. jejuni* [+], *C. coli* [+])
- ③ PCR 法によるジェジュニ/コリの判別