

令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食品微生物試験法の国際調和のための研究」

分担研究報告書

ボツリヌス試験法に関する研究

研究分担者	倉園久生	国立大学法人徳島大学
研究協力者	山崎栄樹	国立大学法人帯広畜産大学
	奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学
	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター
	門間千枝	東京都健康安全研究センター
	河合高生	大阪健康安全基盤研究所
	梅田 薫	大阪健康安全基盤研究所
	幸田知子	公立大学法人大阪府立大学
	小崎俊司	公立大学法人大阪府立大学

**研究要旨：**“食品からの微生物標準試験法検討委員会（検討委員会）”においては、国際調和がとれた微生物試験法の作成が進められている。本研究班では同委員会の試験法作成方針に従ったボツリヌス菌に関する試験法の策定を目的としている。ボツリヌス菌については法規制等による菌株移動や取扱い設備についての制限が多く、試験法作成方針に含まれるバリデーション作業において実施可能な解析が限定的なものとなっているため、これまで検討委員会において本菌を使用したコラボスタディの実施方法について議論がなされてきた。本年度の研究においては、先行研究において整備したボツリヌス遺伝子試験法（Technical Specification）の作業部会案（ステージ2）について、遺伝子検査法に関する研究では、近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある状況を踏まえ、ISO ガイドラインを和訳化した上で、遺伝子検査法作業部会を組織化し、食品からの微生物試験法に PCR 法を採用する上で求められる事項の整理を行った。コラボスタディ（ステージ3）開始前に検討が必要な事項として、スパイク用芽胞液作製プロトコルの検討、簡易 DNA 抽出法の妥当性確認等を実施した。その結果、各コラボスタディ参加機関にて個別に食品への菌添加が実施可能なプロトコルを構築し、また簡易 DNA 抽出法を代替法として用いることで限定的な設備環境下でも実施可能なコラボスタディ作業計画の構築に至った。同作業計画については検討委員会に提案し、同委員会においてコラボスタディの開始が承認された。これを受けて本研究班よりステージ3の第1案(NIHSJ-20TS-ST3)を検討委員会に提示しており、今後、コラボスタディの結果を反映しながら作業部会および検討委員会において改訂作業が進められることとなる。

## A. 研究目的

コーデックス委員会では食品の衛生に関する国際的な整合性の整備を目的として、各国の食品微生物基準を策定するためのガイドラインを示している。この中で食品微生物試験法に関してはISO法を標準とし、同法もしくは科学的に妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。一方で、国内の微生物規格基準は歴史的に独自に開発された試験法を採用してきた。食品流通のグローバル化が進む近年において、本邦で採用される試験法と国際的に利用されている試験法のハーモナイゼーションに対する要求は増しており、国際的通用性を持った標準試験法の国内における整備は急務の課題となっている。これらの課題を受け「食品からの微生物標準試験法検討委員会」（以下、検討委員会）において、現在、国際整合性を踏まえた主要食中毒原因微生物等の標準試験法の作成が進められてきた。これまで、複数の病原微生物・毒素に関する作業部会がデータ収集・解析を行い、同委員会でも妥当性等を協議することで標準試験法を策定している。

本研究では、ボツリヌス菌について国内で利用可能な国際的整合性を持った試験法の策定を目的とする。国内ではボツリヌスに関する検査法として食基発第0630002号・食監発第0630004号（平成15年6月30日）の通知「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」で食品中でのボツリヌス毒素産生性評価法が通知法として示されており、また、衛食第83号（平成10年8月26日）「イタリア産オリーブ加工品に関わる検査命令について」においてはオリーブ加工品からのボツリヌス毒素および

ボツリヌス菌の検査方法が通知されているが、いずれの試験法においてもマウス試験によるボツリヌス菌の同定法が採用されている。一方で、国際的にはISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia（以下、ISO法）およびBAM chapter 17 *Clostridium botulinum*（以下、BAM法）が広く知られており、ISO法においてはボツリヌス毒素遺伝子をターゲットとした方法が、BAM法においてはマウス試験によるボツリヌス毒素検査、免疫学的手法によるボツリヌス毒素タンパク質検査およびボツリヌス毒素遺伝子検査が採用されている。先行研究において我々は、これらの国内外の試験法の比較検証を行い、検討委員会において整備・提案するボツリヌス検査法としてボツリヌス遺伝子を検出指標とした試験法が妥当であるとの結論に至り、検討委員会が示す試験法作成方針に従い、ISO法を基に作成した標準試験法（Technical Specification）の原案（NHISJ-20TS-ST1）を提案し、更に、コラボスタディ（Collaborative study:CS）の実施にむけてNIHSJ-20TS-ST1を元にした標準作業手順書（NIHSJ-20TS-ST2）の整備を行ってきた。本研究においては研究期間内にコラボスタディを通してNIHSJ-20TSの妥当性・実効性の検証を行い、検討委員会での確認・承認の後にNIHSJ法として広く公開することを目的とする。本年度の研究においては、検討委員会から提言されたコラボスタディ開始前に

検討が必要な事項について解析し、検討委員会への提示および議論の後にコラボ実施ステージ（ステージ3）への移行について承認を得た。

## B. 研究方法

### 1. 芽胞液作製プロトコールの整備

1-1) 芽胞形成に要する培養時間に関する検討：*Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) 62A 株をクックドミート培地に接種し、37°C・24 時間で嫌気培養を行った増菌液 1 mL を、TP 培地（5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, pH7.0：培地 A）、0.1%チオグリコール酸ナトリウム加 TP 培地（5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, 0.1%チオグリコール酸ナトリウム, pH7.0：培地 B）、可溶性デンプン加変法クックドミート培地（0.3%グルコース, 0.2%可溶性デンプン加クックドミート培地：培地 C）の各 9 mL に接種し、37°C で 24 時間、48 時間及び 72 時間、嫌気培養を行った。得られた菌液について、80°C・20 分間の加熱処理を行った後、卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養（37°C・24 時間）を行い、発育集落数を求めた（芽胞数）。平行して、培養後の菌液について、加熱処理を経ずに卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養後に発育した集落数を求め（芽胞+栄養型菌の総数）、両者の比から、芽胞形成率を算定した。

1-2) 継代培養回数に関する検討：*C. botulinum* 62A 株をクックドミート培地に接種し 37°C・24 時間の嫌気培養を行った後に得られた増菌液 1 mL を、TP 培地 9 mL に接種し、37°C で 72 時間の嫌気培養を行った。得られた菌液 1 mL を新鮮な TP 培地 9 mL に再び接種し、80°C・20 分間の加熱処理を経

て、37°C で 72 時間の嫌気培養に供した。同操作を更に 3 回繰り返し、それぞれの培養回について、培養開始後 24, 48 および 72 時間後の芽胞形成率を上項と同様の方法で評価した。

### 2. NIHSJ-20TS-ST2 の検出効率に関する検討

芽胞調整プロトコールに従って作製した芽胞液を 10 倍階段希釈後、はちみつ試料に添加し、同試料からのボツリヌス毒素遺伝子検出を NIHSJ-20TS-ST2 に従って解析した。PCR 反応産物の検出には 2.0 % Agarose S (Nippon gene) in 0.5 x TBE buffer および Midori Green Direct を使用した。LOD<sub>50</sub> の算出については ISO16140-2 に記載の方法に従い添加菌量を spore CFU/25g はちみつ試料で算出した（結果については log<sub>10</sub> spore CFU /25g はちみつ試料で示した）。

### 3. 簡易 DNA 抽出キットの妥当性検証

*C. botulinum* 62A 株または *C. botulinum* Okra 株を TPGY 培地に接種後、24 時間嫌気培養を行い、得られた増菌液の階段希釈液について、NIHSJ-20TS-ST2 に記載される CTAB 法のほか、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 並びに Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) を用いて DNA 抽出を行った。CTAB 法では段階希釈液 1 mL を、DNeasy Blood & Tissue Kit では 0.1 mL、Foodproof StarPrep Two Kit では 0.08 mL を DNA 抽出用試料とした。抽出効率の評価は、NIHSJ-20TS-ST2 で示される PCR 法へ DNA 抽出液を適用することに拠った。

### 4. 検討委員会における確認

コラボスタディ開始前に必要な検討事項の解析結果についてコラボスタディ参加機関から構成される作業部会会議にて確認を行った後、コラボスタディ作業計画案を作

成し、第 72 回検討委員会（2020 年 12 月 23 日）に提出しコラボスタディの開始について審議頂いた。加えて第 73 回検討委員会（2021 年 3 月 11 日）に NIHSJ-20ST-ST3 の第 1 案を提示した。

## C. 結果

### 1. スパイク用芽胞液作製プロトコールの整備

我々は先行研究で第 71 回検討委員会（2020 年 2 月 18 日）において、食基発第 0630002 号・食基発第 0630004 号「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」に記載の方法（図 1）に基づく芽胞液作製を行うことについて承認を得ている。しかしながら、同法では芽胞産生用培地の組成が示されていない。そこで本研究では 3 種類の培地を使用した際の芽胞産生性を比較し、安定的な芽胞産生が可能な培地の選択および芽胞液調整プロトコールの作成を行った。芽胞形成に要する培養時間に関する検討を行った結果、全ての培地において 24 時間の培養時間では芽胞形成が確認されず、培養開始後 48 時間以降で安定的な芽胞形成が確認された（図 2）。また、3 種類の培地における芽胞形成数および芽胞形成率を比較した結果、TP 培地（培地 A）で最も高くかつ安定的な芽胞形成率を認めた。更に、継代培養回数に関する検討を目的として上記の試験において最も良い芽胞形成が確認された TP 培地を用いて芽胞形成に与える培養の繰り返し回数の影響について検討した結果、培養の繰り返しによる芽胞形成の速度および芽胞数に大きな変化は観察されなかった（図 3）。

### 2. NIHSJ-20TS-ST2 の検出効率に関する検討

我々は先行研究で第 71 回検討委員会において、コラボスタディの評価基準として LOD<sub>50</sub> による評価が妥当との提案を受けている。そこで、本検討ではコラボスタディに資するプレデータの取得を目的として、NIHSJ-20TS-ST2 を使用して解析を行った際の LOD<sub>50</sub> を試算した（表 1）。全ての試行において、培養開始から 24 時間後の PCR（以下、1<sup>st</sup> PCR）よりも 90 時間後の PCR（以下、2<sup>nd</sup> PCR）でより高い検出感度を示すことが確認された。2<sup>nd</sup> PCR では、上清または沈殿のいずれかが陽性となった試料を総合判定陽性と判定した場合、25g はちみつ試料あたりの添加芽胞数が  $\log_{10}$  CFU = 0.9 以上の場合には全て陽性を示し、 $\log_{10}$  CFU = -0.1 では 3 回のうち 1 回が陽性となった。 $\log_{10}$  CFU = -1.1 では、3 回の試行のうち 2 回が陽性となった。また、 $\log_{10}$  CFU = -11.1 では全てが陰性となった。これらの結果より LOD<sub>50</sub> を試算した結果、 $\text{LOD}_{50} = -0.34 \log_{10}$  CFU/25g はちみつ試料（95%信頼区間の上限値 = 0.26, 下限値 = -0.92）となり、NIHSJ-20TS-ST2 が十分な検出感度を有する試験法であると判断された。

### 3. 簡易 DNA 抽出キットの妥当性検証

NIHSJ-20TS-ST2 で示される DNA 抽出法は、ISO 法と同様に CTAB 法を採用している。しかしながら、CTAB 法は手技が煩雑であり、クロロホルムの使用等、取扱い制限の多いボツリヌス菌を用いた試験法のコラボスタディ実施にあたっては、必ずしも最適とは言い難いことが作業部会で議論された。第 71 回検討委員会では、これらの点を提起し、コラボスタディに DNA 抽出キットを用いることが承認された。これを受け、作業部会では計 2 種類の異なる仕様から成る DNA 抽出

キットを選定した上で、それらの妥当性を判断するために、検出感度に関する検討を行った。DNeasy Blood & Tissue Kit は Proteinase K を用いたタンパク分解後にスピンカラムを用いて DNA を抽出精製する方法である。一方、Foodproof StarPrep Two Kit は物理的に菌体を粉碎後、遠心分離により DNA を抽出する方法となっている。*C. botulinum* 62A 株(表2)または *C. botulinum* Okra 株(表3)の培養液を試料として CTAB 法と2種類のキットの DNA 抽出効率を比較した結果、両キットとも CTAB 法に比較して、*C. botulinum* 62A 株では 10,000 倍以上、*C. botulinum* Okra 株では約 1,000 倍以上の高い抽出効率を認めた。また、2種類のキットのプロトコールを確認したところ、Foodproof StarPrep Two Kit の方が手技的に簡潔であるほか、物理的破碎を密閉環境で行えるため、安全性確保の点からもより有用性が高いとの意見が出た。また、後者については、MicroVal の認証を受けていることも確認された。以上の点を踏まえ、コラボスタディでは Foodproof StarPrep Two Kit の使用が妥当と判断された。

#### D. 考察

本年度の研究においては NIHSJ-20TS に関するコラボスタディの作業計画を決定するあたり事前に検討が必要な事項について解析を行った。解析結果についてはコラボスタディ参加機関間会議による議論を行った後に、第72回検討委員会(2020年12月23日)において報告し、以下の合意を得た。

コラボスタディで使用するスパイク用芽胞液作製プロトコールに関する検討では、

芽胞産生用培地として TP 培地が最も適していると判断され、また、継代培養は繰り返し行ったとしても安定的な芽胞形成に寄与しないことが示された。以上の結果より別添1に示す芽胞調整プロトコールを提案し、62A 株を用いたコラボスタディでは、同プロトコールに従って各機関で調整した芽胞菌液を食品試料添加用菌液として使用する事で合意された。また、62A 株以外の株については、同プロトコールに従い芽胞形成を評価し、十分な芽胞形成が認められない場合には、株毎に芽胞調整プロトコールの整備を行う事となった。NIHSJ-20TS-ST2 の検出効率に関する検討では、シングルコラボスタディの結果として、 $LOD_{50} = -0.34 \log_{10} \text{ spore CFU}/25\text{g}$  はちみつ試料という結果を得た。加えて、簡易 DNA 抽出キットの妥当性検証においては、コラボスタディにおける Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) 使用の妥当性が確認され、コラボスタディにおいて同キットを使用する事で合意された。今後、同キットを用いた際の  $LOD_{50}$  算出を含めたコラボスタディを実施し、同法の更なる妥当性確認を進めたいと考える。

第72回検討委員会では上記データに関する確認を行うとともに、図4に示すコラボスタディ作業計画案の提示を行った。ボツリヌス菌については法規制が強いため、菌株移動や取扱い設備についての制限が多く、コラボスタディによるバリデーション作業において実施可能な解析が限定的なものとなっている。この様な制限の下に実施されるコラボスタディにおいては、取扱いが容易な他種の病原体とは異なるスキームの構築が必要となる。このため、同計画で

はコラボスタディ期間を以下の3つの期間に分割し解析を進める作業計画を提案した。

#### 1) コラボスタディ予備試験期間

主幹機関（試験機関1）にて、はちみつに62A株を添加した際の検出感度を検証し、LOD<sub>50</sub>を求める（DNA抽出キットを使用）。併せて、コラボスタディで使用する添加菌量を決定する。平行して、各コラボスタディ参加機関では、別添1の芽胞調整プロトコールに従って、芽胞液を調整し、芽胞形成率の安定性を検証する。

#### 2) コラボスタディ実施期間

各機関にて、はちみつに対する62A株添加回収試験（4濃度 x 3回繰返し）を実施する。はちみつ試料、培地、DNA抽出キット等は、主幹機関より同一製品・同一ロットを頒布する。各機関で得られた結果について、解析結果の試験所間比較（プロトコールの安定性検証、試験所間の手技の同等性確認）および、コラボスタディ全体でのLOD<sub>50</sub>算出を行った後、バリデーション作業部会に試験法の妥当性に関する確認を依頼する。

#### 3) シングルラボスタディ実施期間

それぞれの機関にてA型菌以外の芽胞液調整および、はちみつ・一般食品への添加回収試験を行い、NIHSJ-20TSの汎用性を検証する。シングルラボスタディではLOD<sub>50</sub>算出等の統計解析は行わず、様々な食品をマトリクスとして使用した際の検出効率の変化（マトリクス-菌型の組合せの影響）についての検証を中心に進める。

第72回検討委員会において上記のコラボスタディ作業計画について確認がなされ、同委員においてNIHSJ-20TSについてコラ

ボスタディの開始（ステージ3への移行）の承認がなされた。これを受けて、第73回検討委員会（2021年3月11日）にNIHSJ-20TS-ST3の第1案を提示し、今後、コラボスタディの結果を反映しながら同委員会において改訂作業が進められることとなっている。

#### E. 結論

1) NIHSJ-20TS コラボスタディにあたって、スパイク用芽胞菌液作製プロトコールの整備及び簡易DNA抽出キットの妥当性を確認した。加えてシングルラボスタディでNIHSJ-20TS-ST2の検出効率を検証した。

2) 第72回検討委員会においてNIHSJ-20TSに関するステージ2の終了及びコラボスタディの開始（ステージ3への移行）が承認された。

3) 第73回検討委員会においてNIHSJ-20TS-ST3原案の提示を行った。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Yamasaki E, Matsuzawa S, Takeuchi K, Morimoto Y, Ikeda T, Okumura K, Kurazono H: Rapid Serotyping of *Salmonella* Isolates Based on Single Nucleotide Polymorphism-Like Sequence Profiles of a *Salmonella*-Specific Gene. *Foodborne Pathog. Dis.*, 18(1): 31-40, 2020.

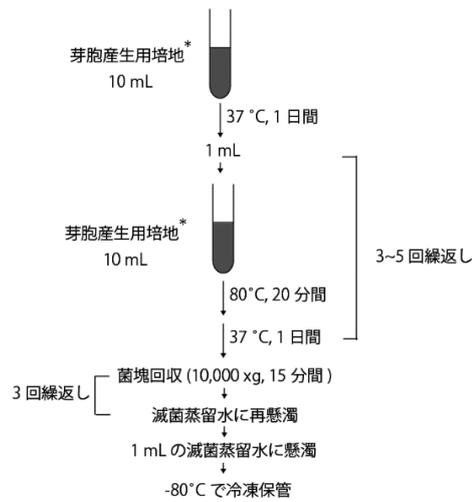
2. Okumura K, Kaido M, Yamasaki E, Akai Y, Kurazono H, Yamamoto S: Genomic Sequences of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains with Various Fluoroquinolone Resistance Profiles.

*Microbiol. Resour. Announc.* 9(38):  
e00199-20, 2020.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

H. 引用文献

- ISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia
- BAM chapter 17 *Clostridium botulinum* (<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm>)
- 食品衛生検査指針微生物編 2018. 第2章 11. ボツリヌス菌.
- ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method



\*芽胞産生用培地の選択肢について

可溶性デンプン加変法クックドミート培地 (クックドミート培地, 0.3% グルコース, 0.2% 可溶性デンプン)

(出典: 食品衛生検査指針)

TP 培地 (5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, pH 7.0)

(出典: H14 年度厚生労働科学研究費補助金「容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価」(小熊ら))

図 1 食基発第 0630002 号・食基発第 0630004 号「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」に記載されている芽胞液作製手順の概要

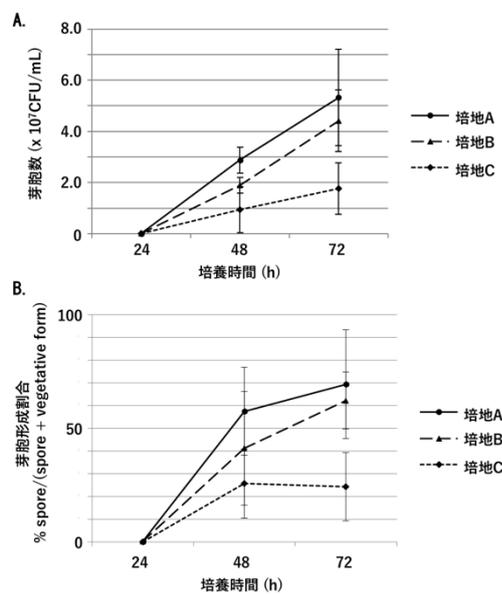


図 2 芽胞形成に要する培養時間に関する検討

TP 培地 (培地 A)、0.1%チオグリコール酸ナトリウム加 TP 培地 (培地 B) および可溶性デンプン加変法クックドミート培地 (培地 C) を用いた際の各培養液中の芽胞数 (A) および芽胞形成割合 (B) を示した。

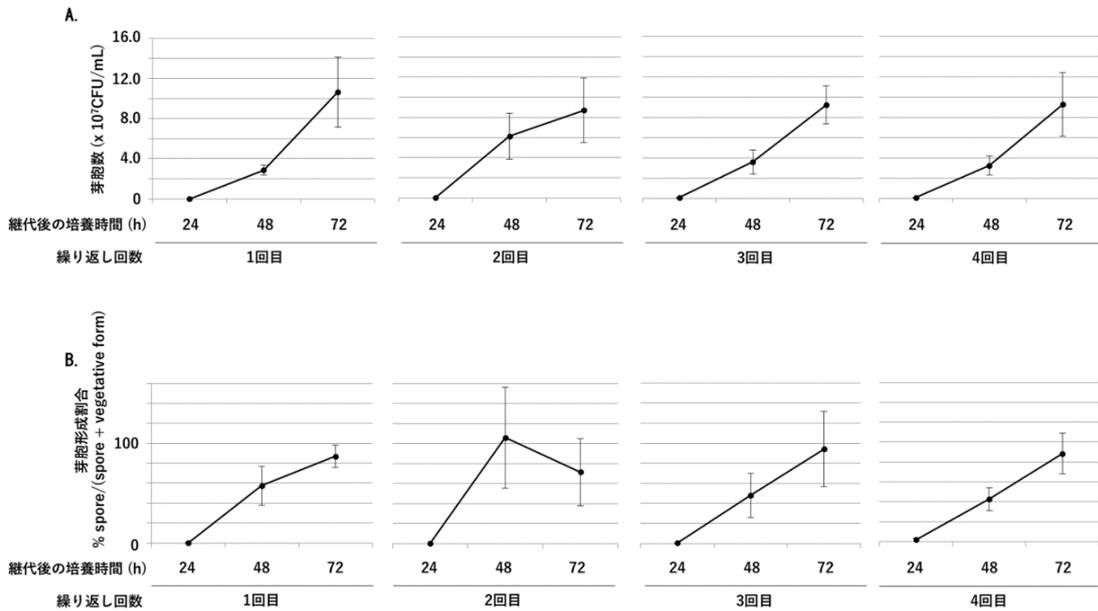


図3 継代培養回数に関する検討

TP 培地を用いて繰り返し培養を行った際の、芽胞数 (A) 及び芽胞形成割合 (B) を示す。

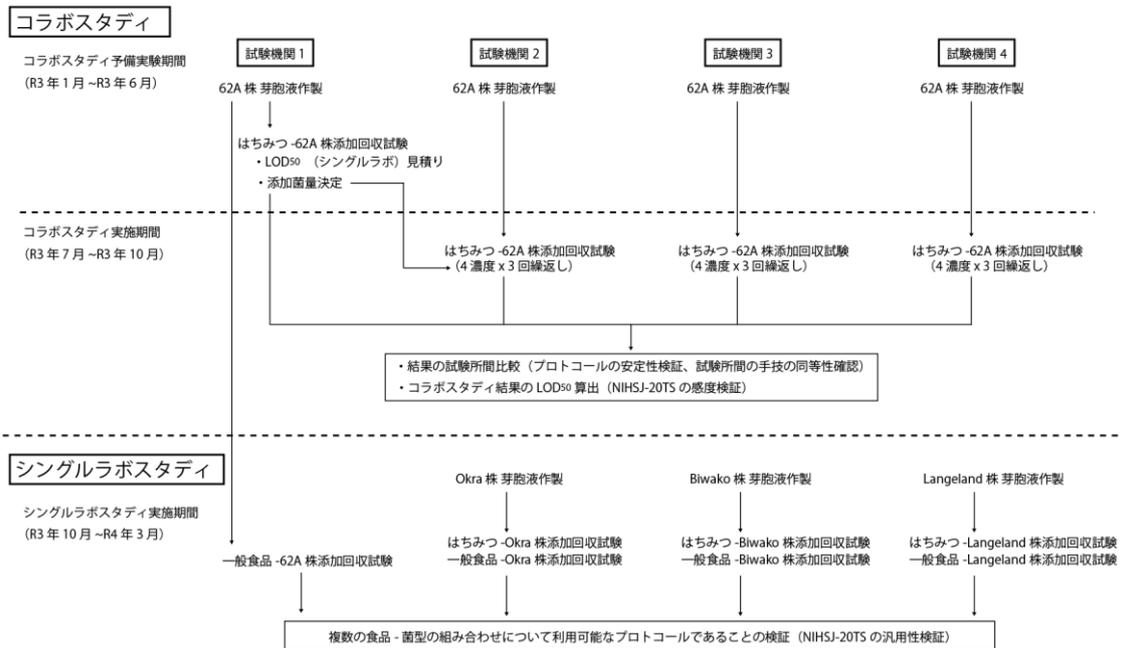


図4 コロボスタディ作業計画

表 1 ボツリヌス A 型 62A 株を用いた添加回収試験による、NIHSJ-20TS-ST2 の検出効率に関する検討

PCR	試料形態	添加芽胞数 (log <sub>10</sub> CFU) *						
		2.9	1.9	0.9	-0.1	-1.1	-11.1	-111.1
1st PCR	上清	0 (1)	0(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(1)	0(1)
	沈殿	1 (1)	2(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(1)	0(1)
2nd PCR	上清	1 (1)	1(3)	1(2)	1(3)	1(3)	0(1)	0(1)
	沈殿	1 (1)	3(3)	2(2)	1(3)	2(3)	0(1)	0(1)
総合判定	-	1 (1)	3(3)	2(2)	1(3)	2(3)	0(1)	0(1)

\*異なる芽胞数を添加したはちみつ試料 25 g よりボツリヌス A 型毒素遺伝子が検出された回数を示す。括弧内の数字は試行回数を意味する。

表 2 *C. botulinum* 62A 株に対する DNA 抽出効率の比較

	菌液濃度 (Log <sub>10</sub> CFU/mL) †						
	6	5	4	3	2	1	0
CTAB method (1 mL)*	+	+	+	-			
DNeasy Blood & Tissue Kit (0.1 mL)*			+	+	+	+	
Foodproof StarPrep Two Kit (0.08 mL)*			+	+	+	+	-

\*括弧内の数値は各法に供した培養液量を示す。

† 10 倍階段希釈した菌液から DNA 抽出を行い、NIHSJ-20TS-ST2 に示す PCR に供した結果、陽性を+、陰性を-で示す。

表 3 *C. botulinum* Okra 株に対する DNA 抽出効率の比較

	菌液濃度 (Log <sub>10</sub> CFU/mL) †					
	6	5	4	3	2	1
CTAB 法 (1 mL)*	+	+	+	-	-	
DNeasy Blood & Tissue Kit (0.1 mL)*			+	+	-	-
Foodproof StarPrep two kit (0.08 mL)*			+	+	+	-

\*括弧内の数値は各法に供した培養液量を示す。

† 10 倍階段希釈した菌液から DNA 抽出を行い、NIHSJ-20TS-ST2 に示す PCR に供した結果、陽性を+、陰性を-で示す。

## C. botulinum 62A 株芽胞液調整プロトコール

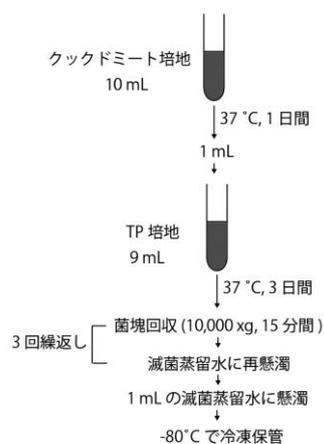
## 1. はじめに

本プロトコールは NIHSJ-20TS に関するコラボスタディで実施する、C. botulinum 62A 株を用いた一般食品およびはちみつへの添加回収試験において使用する添加用芽胞液を調整するためのプロトコールである。

## 2. 芽胞液調整手順

C. botulinum 62A 株の保存培養液（あるいは芽胞懸濁液）を、クックドミート培地に接種し、37℃で1日間嫌気培養する。培養液を、新しい TP 培地に接種し、37℃で3日間培養する。得られた培養液 1 mL を 10,000×g, 15 分間遠心分離して芽胞を回収し、滅菌蒸留水で3回遠心分離による洗浄を行い、再度、1 mL の滅菌蒸留水を加えて均一な芽胞浮遊液とする。浮遊液は適量に分注し、-80℃で保存する。

## 3. フローチャート



## 4. 芽胞浮遊液の芽胞濃度の測定

芽胞浮遊液を 80℃で 20 分加熱後、滅菌生理食塩水を用いて 10 倍段階希釈液を作製する。各段階の希釈液 0.1 mL を卵黄加変法 GAM 寒天培地に塗布し、37℃で 24 時間嫌気培養し、形成したコロニー数を計測する。

## 5. 培地組成および作成方法

### ① クックドミート培地

基礎培地の各成分を加温溶解し、121 °Cにて 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。調製した培地は 5 ± 3 °C で保管する（使用期限：4 週間）。

培地は使用前に沸騰水浴で 15 分間処理した後に急速水冷して脱気する。

基礎組成：10 mL あたり

COOKED MEAT MEDIUM (OXIDO, cat. CM0081,)	1.0 g
蒸留水	10 mL

### ② TP 培地

基礎培地の各成分を加温溶解し、121 °Cにて 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。調製した培地は 5 ± 3 °C で保管する（使用期限：4 週間）。

培地は使用前に沸騰水浴で 15 分間処理した後に急速水冷して脱気する。

基礎組成：1,000 mL あたり

BBL™ Trypticase™ Peptone (BD, cat.211921)	50.0 g
Bacto™ Proteose Peptone No.3 (BD, cat.211693)	50.0 g
蒸留水	1,000 mL
	pH 7.0 ± 0.2

### ③ 卵黄加変法 GAM 寒天培地

基礎培地の各成分を加温溶解し、115 °Cにて 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。

基礎組成：500 mL あたり

GAM Agar, Modified "Nissui" (Nissui, cat.05426)	28.4 g
蒸留水	450 mL

滅菌後の培地を 50°C の水浴で保持した後に、無菌卵黄液 (50%) (KYOKTO, cat.04005) 50 ml を加え、均一化し、滅菌シャーレーに適量加えて平板培地とする。調製した培地は 5 ± 3 °C で保管する（使用期限：4 週間）。

培地は使用前日よりアネロバックケンキをいれたジャーにて 37 °C あるいは 30 °C で一晩処理した後に使用する。

### ⑤ 生理食塩水

各成分を溶解し、121 °Cにて 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。調製した培地は 5 ± 3 °C で保管する。

基礎組成：500 mL あたり

NaCl	8.5 g
蒸留水	1,000 mL
	pH 7.0 ± 0.2