

短報

凍結鶏肉からのカンピロバクター検出のための選択培地に関する検討

伊達佳美, 浅井良夫, 古川一郎, 相川勝弘

Selective Media for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Frozen Chicken

Yoshimi DATE, Yoshio ASAI, Ichiro FURUKAWA
and Katsuhiro AIKAWA

はじめに

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni* / *coli*) を原因とする食中毒は、近年、我が国の食中毒の発生件数の上位を占めるが、その約9割が原因食品不明事例である。(厚生労働省：平成16-20年食中毒発生事例より)。その理由の一つとして、カンピロバクターは、凍結・解凍によりその生残性が著しく減少するため、凍結保存されることの多い検食からの分離が困難であることが知られている^{1) 2)}。

食品における分布では、鶏肉のカンピロバクターの汚染率は非常に高く、分離されるほとんどが *C. jejuni*³⁾ である。市販鶏肉のうち、輸入鶏肉は冷凍で流通しており、主に生で流通している国産鶏肉に比べてカンピロバクターの汚染率および菌数は低い⁴⁾。検出結果に影響を与える要因として、流通形態の違いや凍結の有無が重要であり、検体の状況に応じた培地の選択で結果が異なると想定される。食品中のカンピロバクター分離には、選択増菌培地として、国内では Preston 培地⁵⁾ が汎用されている。この培地には発育サプリメントが添加されるが、これにはピルビン酸やメタ重亜硫酸ナトリウムのような発育を支持する因子が含まれる。一方、国際標準化機構 (ISO) では Bolton 培地⁶⁾ が採用されており、この培地には発育を支持する因子が多く含まれている。これら発育支持因子が含まれた Preston 培地や Bolton 培地はいずれも菌の損傷が予想される食品に対して有効であるとされているが、検体の状況と組み合わせる培地により、検出さ

れる菌種や菌数が異なることが予想される。

そこで、菌種における Preston 培地と Bolton 培地での発育態度の違いや、凍結による影響を確認する目的で、*C. jejuni* と *C. coli* について、温度勾配培養装置を用いて発育状況を確認した。また、検体の状況(冷蔵・冷凍)に適した培養法の検討のため、市販鶏肉を用いて選択増菌培地と分離平板培地を組合せ、培地の組合せごとに *C. jejuni* と *C. coli* の検出率と菌数を比較した。

材料および方法

1. 温度勾配培養装置を用いた菌接種試験

1) 供試菌株

供試菌株は、*C. jejuni* 3株 (ATCC33560, EK07-086, EK07-074,) および *C. coli* 3株 (ATCC 43478, EK07-250, EK07-228) 計6株を使用した。

2) 試験菌液の調製

凍結保存された各供試菌株を血液寒天培地に塗抹し、42℃ 2日間微好気培養後、典型的な集落を BHI broth (DIFCO) 10ml に接種し、37℃ 24時間微好気培養したものを「未凍結」試験菌液とした。また、「未凍結」試験菌液を -20℃ で1日、4日間凍結したものをそれぞれ「1日凍結」、「4日凍結」試験菌液とした。これらの試験菌液を0.1%ペプトン加生理食塩水で段階希釈し、血液寒天培地にて37℃ 48時間微好気培養し、菌数を計測した。

3) 温度勾配培養装置における発育の確認

増菌培地の選択性が無い状態での発育を確認するため、選択サプリメント無添加の Preston 培地 (カンピロバクター発育サプリメント [Oxoid SR084] 加ニュートリエントブロス No.2 [Oxoid CM067]) と Bolton 培地 (ボルトンブイヨン [Oxoid CM983]) を用い、また、各培地に添加される選択サプリメントの影響を確認するため、前記抗生物質無添加 Preston 培地にプレストンカンピロバクター選択サプリメント [Oxoid SR117] を添加した Preston 培地とボルトンブイヨンにボルトン選択サプリメント [Oxoid SR208] を加えた Bolton 培地を用いた。

「未凍結」、「1日凍結」および「4日凍結」試験菌液それぞれについて、選択増菌培地10ml 入りの L 字型培養管に100μl ずつ接種し、微好気混合ガス噴入後ゴム栓をし、振盪温度勾配培養装置 TVS126MA (アドバンテック東洋) を用いて42℃ 48時間60rpm で振盪培養し、660nm における吸光度を1時間ごとに自動測定した。培養開始の OD を0.00、1時間ごとの測定において OD が0.02以上を示し、かつ次の測定

時の OD が0.005以上上昇したときの時間をその菌株の発育開始時間とした。

2. 市販鶏肉におけるカンピロバクターの検出

1) 供試材料

平成19年6月から平成20年10月に、県域の小売店で販売されていた国産生鶏肉31検体、国産冷凍鶏肉6検体、輸入冷凍鶏肉31検体、計68検体を用いた。

2) 試験原液の作製

試験原液の作製と定量試験に用いた選択増菌培地は、5%馬脱繊維血液と選択サプリメントを添加したものを使用した。各検体について、鶏肉の皮部分25gずつを2枚のストマッカー袋に量り取り、一方にPreston培地、もう一方にBolton培地を各100ml加え、1分間ストマッキングし、5倍乳剤（試験原液）を作製した。

3) 最確数（MPN）3本法による定量試験

試験原液と、試験原液をPreston培地あるいはBolton培地で希釈した10倍段階希釈液（10倍～1000倍）を3本ずつ作製し、42℃24時間微好気培養した。それぞれの培養液の1白金耳をmCCDA培地（CCDAサプリメント〔Oxoid SR115〕加カンピロバクター血液無添加選択培地〔Oxoid CM739〕およびPreston平板培地（プレストンカンピロバクター選択サプリメント〔Oxoid SR117〕および5%馬脱繊維血液加カンピロバクター寒天基礎培地〔Oxoid CM689〕）に塗抹し、42℃48時間微好気培養した。培地の組合せを表1に示す。各分離平板培地に発育した疑わしい集落を1平板あたり1～3集落釣菌し、常法に従いカンピロバクターの同定を行った。各検体について、*C. jejuni*あるいは*C. coli*が検出されたものをその菌種の陽性とした。また、MPN法の同じ希釈段階3本のうち、いずれかで検出された場合、その希釈段階での陽性とした。定量試験では、各段階希釈における試験管のカンピロバクターの陽性本数を最確数表にあてはめ、検体100g当たりのMPN値を求めた。

表1 選択増菌培地と分離平板培地の組合せ

培地の組合	選択増菌培地	分離平板培地
BC	Bolton 培地	mCCDA培地
BP	Bolton 培地	Preston 平板培地
PC	Preston 培地	mCCDA培地
PP	Preston 培地	Preston 平板培地

*選択増菌培地は全て5%馬脱繊維血液加・選択サプリメント添加

結 果

1. カンピロバクターの選択増菌培地における発育態度と凍結による影響

42℃における各試験菌液の発育

試験菌液の菌数測定の結果を図1に示す。「未凍結」ではいずれの菌株でも 10^7 CFU/mlレベル、「1日凍結」は 10^5 CFU/mlレベル、「4日凍結」は*C. jejuni*が $10^3\sim 10^4$ CFU/mlレベル、*C. coli*が $10^2\sim 10^3$ CFU/mlレベルと、凍結期間が長いほど菌数が低下する傾向がみられた。

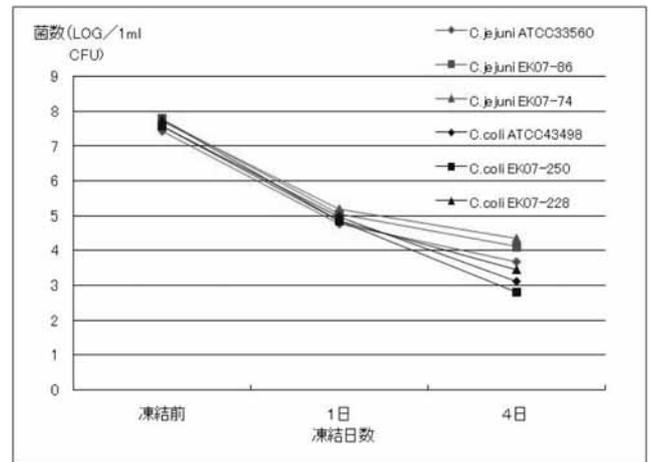


図1 凍結（-20℃）における菌液の保存日数と菌数の推移

Preston培地およびBolton培地の42℃における各試験菌液の発育開始時間を表2に示す。6株の「未凍結」試験菌液を、選択サプリメント無添加培地で培養した場合、菌株により発育開始時間に差がみられたが、培地による差はなかった。選択サプリメント添加により、Preston培地では*C. coli*3株と*C. jejuni*1株（ATCC33560）の発育開始時間が遅延したが、Bolton培地では差がみられなかった。

一方、試験菌液の凍結により、全ての株の発育開始時間が遅延もしくは発育不能となった。Preston培地では選択サプリメント添加により発育開始時間に影響しなかったのは*C. jejuni*2株（EK07-74, EK07-86）のみで、他の4株は、「1日凍結」で発育開始時間が大幅に遅延もしくは発育不能となり、「4日凍結」では選択サプリメント無添加培地でも2株が、選択サプリメント添加によりさらに2株が発育不能となった。Bolton培地では、*C. jejuni*1株（ATCC33560）の「4日凍結」で発育開始時間が遅延したが、他の5株は選択サプリメント添加の有無による発育開始時間の差はみられず、発育不能となる株もなかった。

表2 42℃における試験菌液の発育開始時間

菌株番号	未凍結試験菌液(発育開始時間 :h)				凍結試験菌液(発育開始時間 :h)							
	Bolton培地		Preston培地		1日凍結				4日凍結			
	選択サプリメント		選択サプリメント		Bolton培地		Preston培地		Bolton培地		Preston培地	
	無	添加	無	添加	無	添加	無	添加	無	添加	無	添加
<i>C.coli</i> ATCC43478	6	8	6	26	16	16	21	40	19	19	24	NG
<i>C.coli</i> EK07-250	5	6	6	38	19	19	24	NG	21	21	28	NG
<i>C.coli</i> EK07-228	6	6	6	20	15	16	32	NG	19	19	NG	NG
<i>C.jejuni</i> ATCC33560	11	13	11	22	31	32	29	36	34	47	NG	NG
<i>C.jejuni</i> EK07-86	8	8	7	7	17	17	17	17	21	21	23	24
<i>C.jejuni</i> EK07-74	7	7	7	7	14	14	16	17	15	15	20	20

NG: no growth

2. 培地の組合せによる市販鶏肉からのカンピロバクターの分離状況

1) 各希釈段階における分離状況

検体の状態別の各希釈段階におけるカンピロバクターの分離状況を表3に示す。生鶏肉からの検出率は、*C. jejuni* 67.7% (21/31検体)、*C. coli* 19.4% (6/31検体)、冷凍鶏肉からの検出率は、*C. jejuni* 48.6% (18/37検体)、*C. coli* 35.1% (13/37検体)であった。培地の組合せ別では、生鶏肉から *C. jejuni* の検出率が最も高かったのはPPで64.5% (20/31検体)であったが、*C. coli* は、いずれの組合せでも同じく16.1% (5/31検体)であった。冷凍鶏肉からは選択増菌培地が Preston 培地の場合 *C. jejuni*、Bolton 培地の場合 *C. coli* の検出率が高い傾向を示したが、いずれも大きな差はみられなかった。培地の組合せ別の陽性検体数をみると、カンピロバクターは主に試験原液から検出されているが、BCの組合せ、特に生鶏肉では試験原液からの検出は少なく、*C. jejuni* の61.1% (11/18検体)、*C. coli* の60.0% (3/5検体)が段階希釈液からの検出であった。

表3 市販鶏肉におけるカンピロバクターの分離状況

検体の状態(検体数)	分離菌株	陽性検体数(検出率%)	培地組合せ*	陽性検体数				
				試験原液(×5)	×10 ⁻¹ (×50)	×10 ⁻² (×500)	×10 ⁻³ (×5000)	
生(31)	<i>C.jejuni</i>	21(67.7)	BC	18 (58.1)	7	18	11	4
			BP	17 (54.8)	15	13	8	3
			PC	18 (58.1)	17	16	8	4
			PP	20 (64.5)	20	13	5	4
			PP	5 (16.1)	2	4	4	0
<i>C.coli</i>	6(19.4)		BC	5 (16.1)	5	3	1	0
			BP	5 (16.1)	4	1	0	0
			PC	5 (16.1)	4	1	0	0
			PP	5 (16.1)	4	1	0	0
			PP	5 (16.1)	4	1	0	0
冷凍(37)	<i>C.jejuni</i>	18(48.6)	BC	8 (21.6)	7	4	2	1
			BP	10 (27.0)	8	3	1	0
			PC	13 (35.1)	11	5	1	1
			PP	12 (32.4)	11	2	0	0
			PP	11 (29.7)	7	8	3	0
<i>C.coli</i>	13(35.1)		BC	9 (24.3)	7	5	3	0
			BP	7 (18.9)	6	1	0	0
			PC	7 (18.9)	6	1	0	0
			PP	7 (18.9)	7	1	0	0
			PP	7 (18.9)	7	1	0	0

*培地の組合せについては表1を参照

2) 培地の組合せによるカンピロバクターの菌数分布

MPN法による菌数分布を表4に示す。いずれの培地の組合せでも *C. jejuni* の陽性検体数および菌数

(MPN/100g)は、国産生鶏肉が輸入冷凍鶏肉よりも高い傾向を示した。国産生鶏肉の検出菌数が10³以上の組合せは、BC33.3% (6/18検体)、BP47.1% (8/17検体)、PC55.6% (10/18検体)、PP45% (9/20検体)で、輸入冷凍鶏肉はいずれの培地の組合せでも10³以下であった。一方、*C. coli* の陽性検体数は、輸入冷凍鶏肉が国産生鶏肉よりも多く、検出菌数は国産生鶏肉・輸入冷凍鶏肉ともにそのほとんどが10³以下であった。

表4 培地の組合せと菌数の分布

検出菌種	種類	保存状態(検体数)	培地の組合せ*	陽性検体数	菌数(MPN/100g)			
					>15-10 ²	>10 ² -10 ³	>10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
<i>C.jejuni</i>	国産	生(31)	BC	18	4	8	4	2
			BP	17	7	2	6	2
			PC	18	2	6	7	3
			PP	20	8	3	8	1
			BC	2	0	0	2	0
			BP	0	0	0	0	0
	輸入	冷凍(31)	BC	6	5	1	0	0
			BP	10	7	3	0	0
			PC	11	8	3	0	0
			PP	12	8	4	0	0
			BC	5	3	2	0	0
			BP	5	1	2	2	0
<i>C.coli</i>	国産	生(31)	PC	5	3	2	0	0
			PP	5	4	1	0	0
			BC	2	2	0	0	0
			BP	0	0	0	0	0
			PC	0	0	0	0	0
			PP	0	0	0	0	0
	輸入	冷凍(31)	BC	9	4	4	1	0
			BP	9	5	3	1	0
			PC	7	6	1	0	0
			PP	7	6	0	1	0
			BC	9	4	4	1	0
			BP	9	5	3	1	0

*培地の組合せについては表1を参照

考 察

本実験では、従来から使用されている Preston 培地と日本で標準検査法への導入が検討されている Bolton 培地の培地成分や選択サプリメントが、*C. jejuni* と *C. coli* の発育にどのような影響を与えるのか、温度勾配培養装置を用いて検証した。その結果、*C. coli* は Preston 培地に添加する選択サプリメントで発育が抑制されるが、Bolton 培地では影響を受けないことが示された。選択サプリメントには、数種の抗生物質が含まれており、Preston 培地はポリミキシン B・

リファンピシン・トリメトプリム・シクロヘキシミド、Bolton 培地はセフォペラゾン・バンコマイシン・トリメトプリム・アンフォテリシン B で、Preston 培地の選択サプリメントの成分またはその組合せに *C. coli* が感受性をもち、検出されにくい可能性が考えられた。

試験菌液の凍結により、全ての菌株の発育に影響がみられたが、菌の死滅による菌数の減少か、あるいは菌が損傷しその回復に時間を要したのか、いずれかを判断することは困難であった。しかし、選択サプリメント無添加培地の発育において、Preston 培地では発育不可能な菌株がみられたが Bolton 培地では全て発育したことから、凍結による損傷菌の培養には Preston 培地より Bolton 培地が優れていると考えられた。

一方、市販鶏肉のカンピロバクターの分離状況では、培地の組合せによる検出率に大きな差はみられなかった。検体が生の場合、Preston 培地では夾雑菌の発育が少なく、カンピロバクターの分離がいずれの分離平板培地でも容易であったが、Bolton 培地と mCCDA 培地との組合せでは、試験原液からは夾雑菌の発育によりカンピロバクターが分離されず段階希釈液からの分離が多かったことから、この組合せでは試験原液の希釈が必要であろう。冷凍鶏肉の場合、全体の検出率に対して、個々の培地の組合せによる検出率が低く(表 3)、また、特定の組合せが優れているという結果は得られなかった。冷凍により菌が死滅もしくは損傷し、発育可能な菌が減少したため、あるいは冷凍の条件により菌株の損傷度が異なるため、数種類の選択増菌培地で培養することで全体の検出率が高くなったと考えられる。輸入鶏肉は、冷凍で流通しているため国産鶏肉よりもカンピロバクターの検出率が低いとされているが、今回の検討では *C. coli* の検出率は国産鶏肉よりも高く、菌数も同レベルであった。鶏肉の冷凍前の菌数 (MPN/100g) が 10^3 レベル以上の場合には 90% 以上で菌の生存が認められることから³⁾、冷凍前の

輸入鶏肉の *C. coli* による汚染率や菌数は、国産鶏肉よりも高い可能性が考えられた。国内での感染事例では、臨床で分離されるカンピロバクターのほとんどが *C. jejuni* のため、食品からのカンピロバクターの検出に関する検討は *C. jejuni* を対象としたものが主であるが、海外渡航者からは国内よりも *C. coli* の分離率が高いとの報告もあり³⁾、*C. coli* の検出の動向にも注目すべきと考える。

今回の実験から、カンピロバクターの検査の際、菌種によって培地を使い分ける必要があり、凍結サンプルの場合は従来の Preston 培地に加え Bolton 培地を併用すべきと考える。検体の保存状況や損傷菌を考慮した検査方法を採用することで検出率の上昇が期待できるとともに、原因不明となる食中毒事例の減少に寄与するものと考えられる。

(平成21年8月11日受理)

文 献

- 1) 品川邦汎：カンピロバクター食中毒の発生とその対応，日本食品微生物学会誌，23(3)，124-128 (2006)
- 2) 三澤尚明：増加傾向にあるカンピロバクター食中毒について，食品衛生研究，56(8)，9-16，(2006)
- 3) 坂崎利一編集：新訂 食水系感染症と細菌性食中毒，pp. 336-355，中央法規出版，東京 (2000)
- 4) 小野一晃・安藤陽子・川森文彦・尾関由姫恵・柳川敬子：冷凍保存鶏肉における *Campylobacter jejuni* の生存性とパルスフィールド・ゲル電気泳動法による分離菌株の遺伝子解析，日本食品微生物学会誌，22 (2)，59-65 (2005)
- 5) 伊藤 武：食品衛生検査指針 微生物編，pp. 225-235，(社)日本食品衛生協会，東京 (2004)
- 6) ISO10272-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.