

食肉中のカンピロバクター検出法の検討

下島 優香子, 井田 美樹, 樋口 容子, 金子 誠二, 横山 敬子, 高橋 正樹,
仲真 晶子, 甲斐 明美

Comparative Study on Detection Methods for *Campylobacter* in Meat

Yukako SHIMOJIMA, Miki IDA, Yoko HIGUCHI, Seiji KANEKO, Keiko YOKOYAMA,
Masaki TAKAHASHI, Akiko NAKAMA and Akemi KAI

食肉中のカンピロバクター検出法の検討

下島優香子*, 井田美樹*, 樋口容子*, 金子誠二*, 横山敬子*, 高橋正樹*,
仲真晶子*, 甲斐明美**

食肉の日常検査に高感度で効率的なカンピロバクター (*Campylobacter jejuni* および *C. coli*) 検出法を導入する目的で, 増菌方法としてリンス法, 大量培養法および 10 倍乳剤法を比較した. リンス法と大量培養法で顕著な差異は認められず, リンス法は大量培養法と比較して培地量の少量化や操作性においてすぐれ, 利便性の高い手法と考えられた. しかし 10 倍乳剤法の検出数は極めて少なかった. 増菌培地と分離平板は, Preston 培地による増菌で mCCDA 培地による分離が適していた.

キーワード: カンピロバクター, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, 検査法, Preston 培地, Bolton 培地, mCCDA 培地, Butzler 培地

はじめに

カンピロバクター食中毒の発生件数は全国的に年々増加し, 2009 年は食中毒病因物質の第 1 位を占めるに至った¹⁾. また, 発生件数の 95% 以上は *Campylobacter jejuni* を原因とし, *C. coli* による事例は 5% 以下である. カンピロバクターは家畜や家禽の腸管内に広く分布し, 本菌に汚染された食肉, 特に食鳥肉の生食, 加熱不足での喫食あるいは二次汚染等が食中毒の発生要因となる. 当センターでは大規模製造業監視, 食品流通拠点監視, 輸入食品監視等の一環として, 都内で広域的に流通する食肉や食肉製品を対象としてカンピロバクター検査を行っている.

検査法は食品衛生検査指針微生物編 2004²⁾に準拠し, 食品 25g の 10 倍乳剤の 1 mL を Preston 培地 10 mL に加えて増菌後, mCCDA 培地で分離培養する方法 (以下, 10 倍乳剤法とする) で検査を実施してきた. しかし 10 倍乳剤法では供試する検体量が少ないため, 汚染菌量の少ない検体では検出されない可能性がある. 一方, 食品衛生検査指針には, 食品 25 g を増菌培地 100 mL で振り出して, その 10 mL を中試験管に採り培養するカンピロバクターに特化した増菌方法 (以下, リンス法とする) も記載されている. また, ISO (International Organization for Standardization) では食品の 9 倍量の Bolton 培地を加えた増菌培養法³⁾, FDA (U. S. Food and Drug Administration) の Bacteriological Analytical Manual では食品 25 g に 100 mL の Bolton 培地を加える方法⁴⁾がそれぞれ採用されている. 現在わが国においても, 国立医薬品食品衛生研究所を中心とした「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の作業部会で, 食品 25 g に Preston 培地あるいは Bolton 培地 100 mL を加えて増菌培養する大量培養法 (以下, 大量培養法とする) が提案されている⁵⁾. そこで高感度かつ効率的な検査法の日常検査への導入を目的として, 今回は都内で流通する食鳥肉を用いて, 食品衛生検査指針によるリンス法および大量培養法について 10

倍乳剤法との比較検討を行った.

材料と方法

1. 被検材料

対象とした食肉は, 2009 年度に都内の大規模製造業, 食品流通拠点, 輸入食品の輸入業および倉庫業の業者, 飲食店, 小売店から収去あるいは購入した食鳥肉計 73 件である. その内訳は, 鶏肉正肉 64 件, 鶏レバー 1 件, ゲームミート 8 件 (鴨肉 4 件, アヒル 2 件, ハト 1 件, ウズラ 1 件) である. リンス法と 10 倍乳剤法の比較検討は 73 件全て用いて行い, リンス法と大量培養法の比較検討には, この内の 32 件 (鶏肉正肉 30 件, 鴨肉ゲームミート 2 件) を用いた.

2. カンピロバクターの増菌・分離

カンピロバクターの分離はすべて増菌培養後に行い, 直接分離は行わなかった. 増菌培地には Preston 培地 (Oxoid) および Bolton 培地 (Oxoid) を用いた. これらの増菌培地は, それぞれの基礎培地を調製, 滅菌後に指定の抗菌剤サプリメントと馬脱繊維血液 (最終濃度 5%) を加えて調製される. 分離培地には mCCDA 培地 (Oxoid), Butzler 培地 (Oxoid) を用いた. 増菌培養は微好気条件 (O₂ 5%, CO₂ 10%, N₂ 85%) 下で 42°C, 24 時間行った. 分離培養は増菌培養液を各分離培地に約 0.1 mL 塗抹し, 微好気条件下で 42°C, 44 時間培養した.

増菌培養方法は, 以下の 3 通りの方法で行った. リンス法: 滅菌バックに被検材料 25 g をとり, その中に増菌培地の基礎培地を 20 mL 加えて手もみによりよく振り出し, その振り出し液 10 mL を中試験管に採取した後, サプリメントと馬脱繊維血液を加え微好気培養した. なお被検材料に加える基礎培地量は, より濃厚な振り出し液とするため 100 mL を 20 mL にした. 大量培養法: リンス法で振り出し液 10 mL を採取した残りのバックの中に増菌培地を 100 mL

* 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部

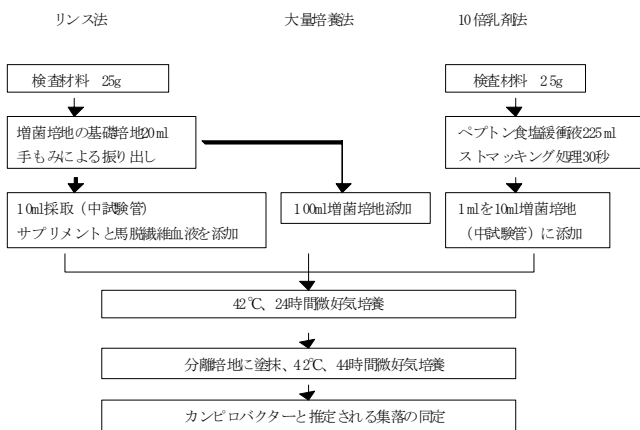


図 1. 食肉中のカンピロバクター検出法

加え、そのまま好気培養した。10倍乳剤法：被検材料 25g のペプトン食塩緩衝液による 10 倍乳剤 1 mL を、中試験管に分注した 10 mL の増菌培地に添加後、好気培養した (図 1)。

3. カンピロバクターの同定

カンピロバクターの同定は常法³⁾に従い、位相差顕微鏡観察によりコルクスクリュー状の独特な運動を行う螺旋状桿菌の確認、1平板1-3コロニーについてナリジクス酸(30 μg) およびセファロチン (30 μg) ディスクによる薬剤感受性試験、馬尿酸加水分解試験、酢酸インドキシル加水分解試験、*C. jejuni* および *C. coli* 特異的 PCR 法^{6,7)}を組み合わせで行った。

結果

1. 食鳥肉からのリンス法および大量培養法によるカンピロバクターの検出

食鳥肉 32 件 (チルド肉 19 件, 凍結肉 13 件) をリンス法

と大量培養法により増菌し、増菌培地および分離培地の組み合わせから、カンピロバクターの検出率を比較検討した。それぞれの方法と増菌培地で分離されたカンピロバクターの菌種は、チルド肉と凍結肉に分けて表 1 に示した。

チルド肉 19 件中、リンス法では Preston 培地で *C. jejuni* 11 件 (73.7%), *C. coli* 2 件 (10.5%), Bolton 培地で *C. jejuni* 11 件 (57.9%), *C. coli* 5 件 (26.3%) であった。大量培養法では Preston 培地で *C. jejuni* 11 件 (57.9%), *C. coli* 3 件 (15.8%), Bolton 培地で *C. jejuni* 11 件 (57.9%), *C. coli* 5 件 (26.3%) であった。

凍結肉 13 件中、リンス法では Preston 培地で *C. jejuni* 3 件 (23.1%), *C. coli* 2 件 (15.4%), Bolton 培地で *C. jejuni* 4 件 (30.8%), *C. coli* 1 件 (7.7%) であった。大量培養法では Preston 培地で *C. jejuni* 5 件 (38.5%), *C. coli* 2 件 (15.4%), Bolton 培地で *C. jejuni* 6 件 (46.2%) のみが検出された。このように、チルド肉および凍結肉いずれにおいてもリンス法と大量培養法において検出率に大きな差は認められなかった。

次に増菌培養後の分離培地別のカンピロバクター検出結果を表 2 に示した。32 件中、Preston 培地で増菌した場合は、リンス法→mCCDA 培地では、*C. jejuni* 16 件 (50.0%), *C. coli* 3 件 (9.4%) が検出され、リンス法→Butzler 培地では、*C. jejuni* が 15 件 (46.9%), *C. coli* が 2 件 (6.3%)、大量培養法→mCCDA 培地では、*C. jejuni* が 14 件 (43.8%), *C. coli* が 2 件 (6.3%)、大量培養法→Butzler 培地では、*C. jejuni* が 12 件 (37.5%), *C. coli* が 5 件 (15.6%) 検出された。一方、Bolton 培地で増菌培養した場合は、リンス法→mCCDA では、*C. jejuni* が 7 件 (21.9%), *C. coli* が 3 件 (9.4%)、リンス法→Butzler 培地では、*C. jejuni* が 15 件 (46.9%), *C. coli* が 4 件 (12.5%)、大量培養法→mCCDA では、*C. jejuni* が 8 件 (25.0%), *C. coli* が 1 件 (3.1%)、大量培養法→Butzler 培地では、*C. jejuni* が 17 件 (53.1%), *C. coli* が 4 件 (12.5%)

表 1. リンス法と大量培養法による食鳥肉からのカンピロバクター検出

検体の状態	検体数	分離菌種	検出検体数 (%)			
			リンス法		大量培養法	
			Preston培地	Bolton培地	Preston培地	Bolton培地
チルド	19	<i>C. jejuni</i>	14 (73.7%)	11 (57.9%)	11 (57.9%)	11 (57.9%)
		<i>C. coli</i>	2 (10.5%)	5 (26.3%)	3 (15.8%)	5 (26.3%)
凍結	13	<i>C. jejuni</i>	3 (23.1%)	4 (30.8%)	5 (38.5%)	6 (46.2%)
		<i>C. coli</i>	2 (15.4%)	1 (7.7%)	2 (15.4%)	0 (0%)

表 2. 食鳥肉増菌培養液からの分離培地別のカンピロバクター検出状況

検体数	増菌培地	分離菌種	検出検体数 (%)			
			リンス法		大量培養法	
			mCCDA培地	Butzler培地	mCCDA培地	Butzler培地
32	Preston培地	<i>C. jejuni</i>	16 (50.0%)	15 (46.9%)	14 (43.8%)	12 (37.5%)
		<i>C. coli</i>	3 (9.4%)	2 (6.3%)	2 (6.3%)	5 (15.6%)
	Bolton培地	<i>C. jejuni</i>	7 (21.9%)	15 (46.9%)	8 (25.0%)	17 (53.1%)
		<i>C. coli</i>	3 (9.4%)	4 (12.5%)	1 (3.1%)	4 (12.5%)

検出された。すなわち、Preston 増菌の場合には mCCDA 培地と Butzler 培地の検出率はほぼ同等で、Bolton 増菌では Butzler 培地の方が mCCDA 培地より検出率はるかに高い成績であった。

2. リンス法と 10 倍乳剤法によるカンピロバクターの検出

食鳥肉 73 件についてリンス法と 10 倍乳剤法によりカンピロバクターの検出を試みた。前述の成績から、増菌および分離培地の組み合わせは、Preston 増菌→mCCDA 分離および Bolton 増菌→Butzler 分離で行った。リンス法で検出されたカンピロバクターは、食鳥肉 73 件中 Preston 培地による増菌で 33 件 (45.2%)、Bolton 培地による増菌で 32 件 (43.8%) であった。またいずれかの増菌培地で検出された検体は 37 件 (50.7%) であった。一方 10 倍乳剤法は Preston 培地でのみ行ったが、カンピロバクターが検出されたのは 6 件 (8.2%) のみであった (表 3)。10 倍乳剤法で検出された 6 検体はすべてリンス法でもカンピロバクターが検出された。

3. リンス法によるカンピロバクター検出状況

リンス法で増菌培地別に検出された菌種は、チルドの食鳥肉 43 件からは Preston 培地による増菌で *C. jejuni* が 23 件 (53.5%)、*C. coli* が 3 件 (7.0%) であり、Bolton 培地による増菌で *C. jejuni* が 18 件 (41.9%)、*C. coli* が 9 件 (20.9%) であった。凍結の食鳥肉 30 件からは Preston 培地による増菌で *C. jejuni* が 8 件 (26.7%)、*C. coli* が 2 件 (6.7%) であり、Bolton 培地による増菌で *C. jejuni* が 7 件 (23.3%)、*C. coli* が 3 件 (10.0%) であった。このように、Preston 増菌では *C. jejuni* が、Bolton 増菌では *C. coli* がより検出される傾向がみられた (表 4)。

考察

現在国内で検討されている「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の作業部会では ISO 法に準拠した大量培養法が試案として提案されている。しかし、大量培養法は使用する培地量が 100 ml と多く、それを入れた滅菌バックのまま培養するために広いスペースが必要であるため、微好気培養条件を必要とするカンピロバクター検査においては、操作性およびコスト面から問題がある。今回リンス法と大量培養法を比較検討した結果、リンス

法は大量培養法に劣らない成果を得たこと、また 10 倍乳剤法に比較して非常に検出効率のよい方法であることが明らかになったことから、日常検査にはリンス法が妥当と考えられた。

増菌培地と分離培地の組み合わせにおいて、選択力の弱い Bolton 培地による増菌では、分離培地として mCCDA 培地よりも選択力の強い Butzler 培地での検出率が高かった。その理由として、Bolton 培地は凍結等により損傷した菌の回復を強化しているため選択性が弱く、過剰増殖したカンピロバクター以外の夾雑菌や基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌⁸⁾を mCCDA 培地に含有される主

表 3. リンス法と 10 倍乳剤法による食鳥肉からのカンピロバクター検出

検体数	増菌・分離培地	検出検体数 (%)	
		リンス法	10倍乳剤法
73	Preston-mCCDA	33 (45.2)	6 (8.2)
	Bolton-Butzler	32 (43.8)	実施せず

要選択剤であるセフトオペラゾンで抑制できないためであると考えられる。最近、mCCDA 培地の改良品⁹⁾が発売され、本培地で Bolton 増菌液から分離した場合、ESBL 産生菌の増殖抑制効果があることを著者らは経験している。また、Preston 増菌液から Butzler 培地に分離した場合に *Pseudomonas* 属菌の発育が旺盛でカンピロバクターの分離が不能となる検体も散見された。検体により夾雑菌の量は異なるが、全体的には Preston 培地による増菌では mCCDA 培地、Bolton 培地による増菌では mCCDA 培地より選択力の強い Butzler 培地が適していた。

食鳥肉の保存状態別の検出率では、凍結肉の検出率はチルド肉より低かった。これは、凍結により菌が損傷を受けているため増殖しにくいことが考えられる。Bolton 培地は選択力を弱め、損傷菌に適した培地として考えられている。しかし今回の検討では、凍結肉において Preston 培地と Bolton 培地で検出率の差はみられず、その効果は認められなかった。菌種別では *C. jejuni* は Preston 培地での増菌から、*C. coli* は Bolton 培地での増菌から多く検出された。これは増菌培地に選択剤として使用されている抗生物質に対する感受性の差が反映している可能性が考

表 4. リンス法により食鳥肉から検出されたカンピロバクターの菌種

検体の状態	検体数	分離菌種	検出検体数 (%)	
			Preston培地	Bolton培地
チルド	43	<i>C. jejuni</i>	23 (53.5%)	18 (41.9%)
		<i>C. coli</i>	3 (7.0%)	9 (20.9%)
凍結	30	<i>C. jejuni</i>	8 (26.7%)	7 (23.3%)
		<i>C. coli</i>	2 (6.7%)	3 (10.0%)
計	73	<i>C. jejuni</i>	31 (42.5%)	25 (34.2%)
		<i>C. coli</i>	5 (6.8%)	12 (16.4%)

えられる。カンピロバクター食中毒および感染症の殆どは *C. jejuni* によることを考慮すると、現状ではリンス法による Preston 培地と mCCDA 培地組み合わせが妥当であるが、*C. coli* による散発例・集団例もあることから、今後カンピロバクターの増菌培地については更なる検討が必要であると考えられた。

食鳥肉 73 件のうちリンス法によって 37 件 (50.7%) からカンピロバクターが検出され、約半数の肉にカンピロバクター汚染があった。今回用いた 73 検体の搬入元別では、大規模製造業、食品流通拠点、輸入業および倉庫業者では 51 件中 25 件 (49.0%)、小売店は 20 件中 11 件 (55.5%)、飲食店は 2 件中 1 件 (50.0%) からカンピロバクターが検出され、食肉の業態種による大きな差異は認められなかった。

今回検討した高感度な検査法を日常検査に導入することで、カンピロバクター食中毒の予防対策を講ずる上で、より有効なデータの提供が可能となるものと考えられる。

謝 辞 本調査を実施するにあたりご協力頂いた当センター広域監視部、都・区保健所の関係者の皆様に深謝します。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：食中毒統計資料 平成 21 年 (2009 年) 食中毒発生状況、<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html> (2010 年 7 月 13 日現在、なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 2) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 微生物編, 225-235, 2004, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京.
- 3) International Standard, Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method, ISO 10272-1, 2006, International Organization for Standardization, Geneva.
- 4) Bacteriological Analytical Manual, Chapter 7, *Campylobacter*, 2001, U. S. Food and Drug Administration, U. S. A.
- 5) 食品からの微生物標準試験法検討委員会 カンピロバクター ステージ 2 (作業部会案), <http://www.nihs.go.jp/fhm/kensahou-index.html> (2010 年 7 月 13 日現在、なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 6) Winters, D. K., Slavik, M. F., : *Mol. Cell. Probes*, **9**, 307-310, 1995.
- 7) Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2658-2572, 1997.
- 8) Warren, R. E., Ensor, V. M., O'Neill, P., *et al.* : *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 504-508, 2008.
- 9) 中野倫太, 金子考昌, 久保亮一, 他 : 日臨微誌, **19**, 197, 2009.

Comparative Study on Detection Methods for *Campylobacter* in Meat

Yukako SHIMOJIMA*, Miki IDA*, Yoko HIGUCHI*, Seiji KANEKO*, Keiko YOKOYAMA*,
Masaki TAKAHASHI*, Akiko NAKAMA* and Akemi KAI*

The three-detection method was examined to establish a sensitive and effective isolation method for *Campylobacter* in meat. When the large-scale culture method and the rinsed sample culture method were compared using 32 poultry meats, a remarkable difference was not found. The rinsed sample culture method in test tubes was easy and convenient for the small culture apparatus.

Thirty-seven of 73 poultry meats were positive for *C. jejuni* and *C. coli* using the rinsed sample culture method, while 6 of 73 were positive using the 10×-dilution culture method. For isolation of *C. jejuni*, a combination of Preston enrichment with modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA) isolation or Bolton enrichment with Butzler isolation gave good results.

This study suggests that a protocol using a rinsed sample culture method and selective media for enrichment and isolation is convenient and efficient for isolation of *Campylobacter* from meat.

Keywords: *Campylobacter*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, isolation method, Preston enrichment broth, Bolton enrichment broth, mCCDA agar, Butzler agar

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan