

牛肝臓からの *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* の検査法横山 敬子^a, 赤瀬 悟^b, 高橋 正樹^c, 貞升 健志^d

Campylobacter fetus subsp. *fetus* (以下 Cff) は、ヒト対し敗血症、髄膜炎、下痢等の多様な疾病を引き起こす。ヒトにおける *C. fetus* 感染症の一因として、牛肝臓の生食が指摘されているが、食品を対象とした Cff の標準試験法はない。そこで、牛肝臓からの Cff の検査法について検討した。その結果、Bolton 増菌培地で 37°C、48 時間、微好気培養後、培養液を選択分離培地の CCDA (SEL)、Skirrow 培地に塗抹し、30°C、48~72 時間、微好気培養条件下で、Cff を容易に分離することが可能となった。また、Cff と *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (以下 Cfv) を鑑別するリアルタイム PCR 用プライマーを開発した。さらに、選択分離培地を 30°C および 42°C の 2 種類の温度で培養することで、同一検体から Cff だけでなく *C. jejuni* や *C. coli* の検出も可能となり、食中毒検査における効率的な食品からの検出法と考えられた。

キーワード : *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, 培養方法, Bolton 増菌培地, 牛肝臓, 食中毒, リアルタイム PCR

緒言

Campylobacter fetus subsp. *fetus* (以下 Cff) は、ヒトに対し、敗血症、脊髄炎、髄膜炎、心内膜炎、下痢等の多様な疾病を引き起こす原因菌として知られている¹⁾。特に、糖尿病、肝硬変、免疫不全などの基礎疾患を持つ患者には、重篤な症状を誘因する可能性が高い。一方、Cff は *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (以下 Cfv) と共に、ウシやヒツジ等の家畜の流産の原因菌として獣医学領域で古くから知られている人獣共通感染症の原因菌でもある。品川らが実施した調査では、肉牛からの *C. fetus* 分離率は 6.6% と報告されている²⁾。ヒトにおける *C. fetus* 感染症の一因に、生牛肝臓の喫食が挙げられる^{3,4)}。特に小児科領域では、妊娠中の母親が牛レバ刺しを喫食したことで、子

宮内で胎児が Cff に感染し、新生児に重篤な後遺症が残った症例が複数報告されている^{5,6)}。

一方、わが国では、*C. fetus* を原因菌とした集団食中毒事例の報告件数は少なく、Table 1 に示したように 4 事例があるのみである⁷⁾。2011 年に、我々は東京と千葉では発生した Cff を原因菌とした集団食中毒事例(東京都:患者 2 名、千葉県:患者 1 名)の検査を実施した。主な患者の症状は、下痢、腹痛、発熱などで、一般的なカンピロバクター食中毒様症状と類似しており、共通食として「牛レバ刺し」を喫食していた。

これまで、生肉等からの Cff 分離例⁸⁾および検査法等^{9,10)}についての報告はあるが、*C. jejuni*, *C. coli* で示されているような標準試験法の検討は行われておらず、Cff 食中毒事

Table 1. Outbreaks of *Campylobacter fetus* enteritis in Japan

Case no.	year	Place of occurrence	No. of patients /no. of people eaten	Estimated cause food	Symptoms	%
1	2004	Osaka	9/31	Raw beef liver,	Diarrhea	100
				Yukke,	Fever	100
				Korean barbecue, etc	Abdominal pains	67
2	2006	Tokyo	4/4	Raw beef liver,	Diarrhea	100
				Korean barbecue, etc	Fever	100
					Abdominal pains	50
3	2009	Tokyo	2/2	Raw beef liver,	Diarrhea	100
				Korean barbecue, etc	Fever	50
					Abdominal pains	50
4	2011	Tokyo, Chiba	6/9	Raw beef liver,	Diarrhea	100
				Yukke,	Fever	100
				Korean barbecue, etc	Abdominal pains	83

^a 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 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

^c 当時: 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

^d 東京都健康安全研究センター微生物部

Table 2. Primer sets used to *C. fetus* subspecies identification method by real-time PCR in this study

Species	Primer name	Sequence (5'→3')	Target gene	Amplicon size (bp)	Cff	Cfv
<i>C. fetus</i> common	CP000487	F: ACA GCT CTT AGT ATA TGT CAG ATT GG R: CGG CTA AAT GTC CGA TGT TTT T	<i>nahE</i>	166	+	+
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	AM260752	F: AAA ACC TGA TGA ATT AAC TCG TGG R: TTG GTC ATT TGA ACT AAC TCT TGC	<i>ISCfeI</i>	136	-	+

例に対応する試験法もない。そこで、Cff 食中毒発生時に有用で簡便かつ迅速な検査法についての検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. Cff の選択培地および増菌培地の比較検討

1) 使用培地

供試菌株の培養には BHI broth (Difco 製)、菌液の希釈には滅菌生理食塩水を用いた。増菌培地は *C. jejuni*, *C. coli* の検査法に汎用されている Preston 増菌培地 (Oxoid 製)、Bolton 増菌培地 (Oxoid 製) を用い、各増菌液には 5% 量の馬脱繊維血を加えた。選択分離培地は *Campylobacter* 属菌の分離培地に汎用されている mCCDA (Oxoid 製)、CCDA (SEL) (Oxoid 製)、Skirrow 血液寒天培地 (Oxoid 製)、Butzer 血液寒天培地 (Oxoid 製)、ブルセラ血液寒天培地 (Oxoid 製) を各処方準じて作製した。

2) 供試菌株および菌液の調整

供試菌株は、ヒト由来株 Cff 6 株 (血清型 Type A 3 株 : CP05-65, CP06-268, CP08-361, 血清型 Type B 3 株 : CP10-59, CP10-355, HP9330) およびリアルタイム PCR の検出用として基準株 Cff ATCC27374^T (血清型 Type B), Cfv NCTC 10354^T の計 8 株を用いた。-80°C で凍結保存していた上記菌株は、ブルセラ血液寒天で 37°C, 48 時間微好気培養後、発育した集落を白金耳で BHI broth に接種し、37°C, 24~48 時間微好気条件で振とう培養した増菌液 (10⁸~10⁹ CFU/mL) を菌液とした。

3) Cff および Cfv の菌種鑑別用リアルタイム PCR プライマーの設計

Cff および Cfv の鑑別用リアルタイム PCR プライマー¹⁾ は、*C. fetus* common 遺伝子および *C. fetus* subsp. *venerealis* を標的とし HYBsimulator Ver.4.0 software (Funakoshi Co., Ltd.) を用いて設計した (Table 2)。標準菌株 Cff (ATCC 27374^T) および Cfv (NCTC 10354^T) 菌株を用いて、その評価を行った。

4) 培養方法

(1) 選択分離培養法 選択分離培地 (mCCDA, CCDA (SEL), Skirrow, Butzer 血液天培地) をミスラ法により評価した。すなわち、各菌株の菌液を生理食塩水で 10⁰~10⁻⁸ CFU/mL になるよう 10 倍段階希釈した。各濃度の希釈液を各種選択分離培地に 50 μL 滴下し、25°C, 30°C, 37°C

で 72 時間 微好気培養後、各平板上の菌数を測定した。

(2) 増菌培養法 BHI broth で培養した菌液を滅菌生理食塩水で 10²~10³ CFU/mL に調整した。Preston および Bolton 増菌培地各 10 mL に、調整した菌液 100 μL を接種した。25°C, 30°C, 37°C にて 24, 48, 72 時間微好気培養後、ブルセラ血液平板に塗抹し、37°C, 48 時間微好気培養した後 Cff 菌数を測定した。

2. 生牛肝臓への Cff 接種試験

都内精肉店で購入した牛肝臓 (冷凍品) に Cff の自然汚染が無いことを確認し、接種試験に供試した。解凍した牛肝臓を 25 g ずつストマッカー袋にサンプリングし、Cff (ATCC 27374^T) を 1.8×10², 1.8×10³, 1.8×10⁴ CFU/25g 接種した後、4°C で 1 時間静置した。Bolton 増菌培地 225 mL を加え、37°C, 48 時間微好気培養した。増菌培養液中の Cff 菌数をリアルタイム定量 PCR により算出した。すなわち、増菌培養液 1 mL を 12,000 rpm で 3 分間遠心後、上清を除去し、DW200 μL を添加し沈査を再浮遊させ、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。リアルタイム PCR 法は、Applied Biosystems 7500 を用い、SYBR Green I を用いたインターカーター法で行った。抽出したテンプレート DNA 2 μL, 各プライマー (20 pmol/μL) 0.2 μL, SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μL, Plus solution 2 μL, DW 5.6 μL の組成で最終液量を 20 μL とした。同様の操作で抽出した ATCC 27374^T 株の DNA を希釈し検量線を作成し、増菌液中の Cff 菌数を算出した。また、各種選択分離培地上における Cff とその他雑菌との発育状況を確認した。

結 果

1. Cff および Cfv のリアルタイム PCR による定量

今回設計したリアルタイム PCR プライマーを用いて、標準菌株 Cff (ATCC 27374^T) および Cfv (NCTC 10354^T) の Dissociation Curve を Fig.1 に示した。CP000487 のみが陽性の場合を Cff, CP000487 および AM260752 が共に陽性の場合を Cfv と判定した。また、*C. fetus* common の CP000487 プライマーを用いてリアルタイム定量 PCR 法を 3 回ずつ実施し、Cff 菌数と Ct 値の関係を検討した結果、直線性 (R²=0.9984) を示した (Fig.2)。

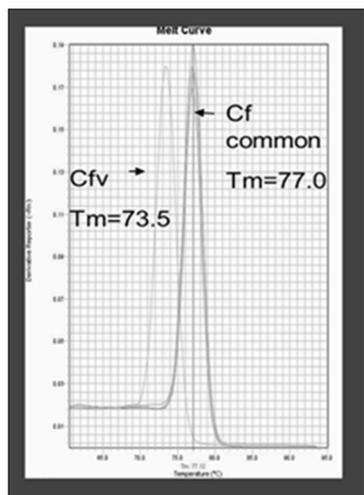


Fig.1. Dissociation curve of Cf common and Cfv

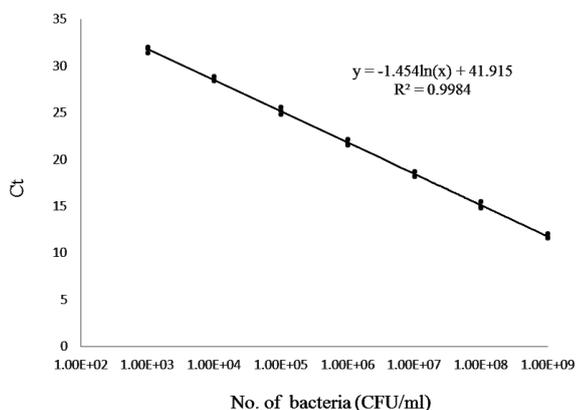


Fig. 2. Relationship between no. of Cff and threshold cycle

2. 培養温度別の各種選択分離培地の評価

ヒト由来 Cff 6 株をミスラ法に従い各選択分離培地に 50 μ L 滴下し、各培養温度で 72 時間、微好気培養後、平板上に発育した菌数を Table 3 に示した。

25°C 培養における mCCDA 上の菌株は発育不良で、集落の形状は極小であり、平板からの Cff の釣菌は困難であった。一方、CCDA (SEL) および Skirrow 血液寒天培地では、供試した 6 株のうち 5 株で良好な集落の発育が認められたが、1 株 (HP9330) は発育不良であった。

30°C および 37°C 培養では、mCCDA, CCDA (SEL) および Skirrow 血液寒天培地において、全供試株の良好な発育を認めた。しかし、Butzler 血液寒天培地では、いずれの培養温度においても HP9330 株は発育不良となった。

3. 増菌培地の Cff 発育状況

Preston および Bolton 増菌培地に Cff を接種した。接種時の Cff 菌数は 0.4~14 CFU/mL であった。各増菌培地を

25°C, 30°C, 37°C において 24, 48, 72 時間、微好気培養後、ブルセラ血液平板に塗抹し、37°C, 48 時間、微好気培養後の Cff 菌数を測定した (Table 4)。

1) Preston 増菌培地

25°C および 30°C, 72 時間培養では、供試した菌株すべてで Cff の増殖は確認できなかった。37°C 培養では、血清型 Type A の 3 株中 2 株が 48 時間で 2.4×10^3 , 4.0×10^2 CFU/mL, さらに、72 時間では 3 株が 1.4×10^6 , 2.0×10^1 , 8.6×10^6 CFU/mL に増殖した。血清型 Type B の 3 株は、いずれの培養条件においても Cff の増殖は確認できず、血清型 Type B の増菌培地として Preston 増菌培地は不適であった。

2) Bolton 増菌培地

30°C, 72 時間培養では、血清型 Type A 全株の菌数が 10^6 CFU/mL 以上に増殖していた。血清型 Type B は、 1.0×10^2 , 2.4×10^6 , 5.2×10^5 CFU/mL と菌株によって菌数のばらつきが認められた。37°C, 48 時間では、血清型 Type A は 4.5×10^6 , 4.1×10^7 , 8.4×10^5 CFU/mL, 血清型 Type B は、 1.2×10^6 , 4.4×10^4 , 1.6×10^5 CFU/mL となり、すべての供試菌株の菌数が 10^4 CFU/mL 以上に増殖していた。

4. 牛肝臓への Cff 接種試験

牛肝臓を解凍し 25g ずつストマッカー袋に入れ Cff (ATTC 27374^T) を接種した。接種菌数は、 1.8×10^2 , 1.8×10^3 , 1.8×10^4 CFU/25g の 3 段階 (低・中・高濃度) とした。Bolton 増菌培地を 225mL 加え、37°C, 48 時間、微好気培養した。培養後、リアルタイム定量 PCR により培養液中の Cff 菌数を概算した。低、中、高濃度に接種した培養液中の Cff 菌数は、それぞれ 1.4×10^4 , 1.6×10^4 , 1.4×10^5 CFU/mL であった。増菌液 50 μ L を CCDA (SEL) に塗抹し、平板を 30°C, 37°C で 48 時間微好気培養した。結果を Table 5 に示す。37°C 培養では、平板上に夾雑菌が多く発育し Cff の分離は困難であった。30°C 培養では夾雑菌は少なく 37°C に比較して Cff の分離が容易となった。

考 察

食品衛生法に基づき、2012 年 7 月 1 日から牛肝臓の生食が禁止された。本法の改正は、2011 年に発生し甚大な被害をもたらした腸管出血性大腸菌による集団食中毒事例が契機となって施行された。この集団食中毒事例の原因食品は「牛生ユッケ」であったが、牛肝臓についてもその内部から腸管出血性大腸菌が検出され、安全に牛肝臓を生食する方法がないことを理由とし、牛肝臓の生食禁止措置が採られたものである。牛肝臓の生食は、腸管出血性大腸菌感染症のみならず、サルモネラ症やカンピロバクター症などによる胃腸炎の発症リスクを孕んでいる。本法施行以前、都内で発生したカンピロバクター食中毒事例の約 20% は、牛肝臓の生食あるいは加熱不足を原因としたものであり、原因菌の多くは牛肝臓内部に存在する *C. jejuni* によるものであった¹²⁾。Cff も *C. jejuni* と同様に牛肝臓内部に保菌されているため、生食によるリスクがある。

Table 3. Results of Cff growth ability by the Miles & Misra method

Serotype	Strain No.	Dilution	Culture condition														
			25°C				30°C				37°C						
			Blood agar	mCCDA	CCDA (SEL)	Skirrow	Butzler	Blood agar	mCCDA	CCDA (SEL)	Skirrow	Butzler	Blood agar	mCCDA	CCDA (SEL)	Skirrow	Butzler
TypeA	CP05-65	10 ⁻⁵	>100	+ tiny*	>100	>100	>100	0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	
		10 ⁻⁶	77	+ tiny*	70	67	0	70	41	75	70	65	70	35	70	50	70
		10 ⁻⁷	7	+ tiny*	10	9	0	12	2	11	7	13	15	4	13	15	9
		10 ⁻⁸	1	0	2	2	0	1	0	1	2	1	2	0	1	2	2
	CP06-268	10 ⁻⁵	>100	+ tiny*	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
		10 ⁻⁶	62	0	69	69	30	70	58	70	70	50	75	53	60	80	50
		10 ⁻⁷	6	0	8	7	3	3	6	9	9	7	2	3	6	12	6
		10 ⁻⁸	0	0	1	0	0	1	0	0	3	1	2	0	2	1	0
CP08-361	10 ⁻⁵	>100	+ tiny*	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	
	10 ⁻⁶	70	+ tiny*	70	+	42	70	61	80	80	60	80	47	87	70	60	
	10 ⁻⁷	10	0	8	3	9	10	8	10	9	12	9	7	9	16	7	
	10 ⁻⁸	1	0	1	2	0	3	0	1	4	0	2	0	0	1	2	
	CP10-59	10 ⁻⁵	>100	+ tiny*	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
		10 ⁻⁶	80	+ tiny*	90	88	88	80	57	90	70	70	80	30	90	88	88
		10 ⁻⁷	17	+ tiny*	16	12	6	12	7	8	14	13	12	5	7	16	17
		10 ⁻⁸	2	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
TypeB	CP10-355	10 ⁻⁵	>100	+ tiny*	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	
		10 ⁻⁶	70	+ tiny*	63	60	50	55	63	66	60	50	60	41	70	60	70
		10 ⁻⁷	10	+ tiny*	11	8	5	2	3	6	10	12	5	5	8	9	13
		10 ⁻⁸	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	HP9330	10 ⁻⁵	>100	+ tiny*	>100	70 tiny*	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
		10 ⁻⁶	61	0	60 small*	7 tiny*	58 tiny*	60	36	70	75	70 tiny*	90	24	70	60	60 tiny*
		10 ⁻⁷	18	0	11 small*	0	6 tiny*	12	3	9	13	4 tiny*	10	1	15	8	5 tiny*
		10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	2	0	6	1	1 tiny*	1	0	0	0	1 tiny*

*: Microcolony growth which were not Cff-like colonies
Incubation time was for up to 72h.

Table 4. Time course of the number of Cff bacteria in enrichment medium

Serotype	Strain No.	Inoculum amount (CFU/mL)	Culture time	No. of Cff (CFU/mL)					
				Preston broth			Bolton broth		
				25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C
Type A	CP05-65	1	24h	0	0	0	0	0	0
			48h	0	0	2.4×10^3	6.0×10^1	3.2×10^4	4.5×10^6
			72h	0	0	1.4×10^6	5.3×10^4	1.3×10^7	5.6×10^7
	CP06-268	0.8	24h	0	0	0	0	0	0
			48h	0	0	0	0	1.5×10^4	4.1×10^7
			72h	0	0	2.0×10^1	1.0×10^2	6.5×10^6	6.4×10^7
	CP08-361	0.8	24h	0	0	0	0	0	0
			48h	0	0	4.0×10^2	0	2.8×10^3	8.4×10^5
			72h	0	0	8.6×10^6	0	3.4×10^6	2.2×10^7
CP10-59	14.0	24h	0	0	0	0	0	0	
		48h	0	0	0	0	0	1.2×10^6	
		72h	0	0	0	0	1.0×10^2	2.0×10^6	
Type B	CP10-355	0.6	24h	0	0	0	0	0	0
			48h	0	0	0	4.0×10^2	3.2×10^3	4.4×10^4
			72h	0	0	0	4.8×10^3	2.4×10^6	3.7×10^6
HP9330	0.4	24h	0	0	0	0	0	0	
		48h	0	0	0	0	1.5×10^3	1.6×10^5	
		72h	0	0	0	4.2×10^3	5.2×10^5	2.0×10^6	

今回、Cff は培養条件の違いにより、菌株ごとの発育に大きな差が生じることが確認された。特に、発育が弱い株では、Butzler 血液寒天培地のような選択性が強い平板培地上での発育は困難となり、本菌の検出として、Butzler 血液平板を一樣に使用するのとは適さないことが判明した。

Campylobacter 分離培地として汎用されている mCCDA 培地を用いた 25°C 培養では、供試した Cff 6 株すべてが発育不良となった。加えて mCCDA は ESBL 産生菌の発育を抑制することができないため、試料中に ESBL 産生菌が含まれていると、目的とする *Campylobacter* 属菌の分離率を低下させる可能性がある。以上のことから、Cff 選択分離培地には、CCDA (SEL)、Skirrow 血液寒天培地が有用であることが示唆された。

牛肝臓などの食肉には、Cff のみならず *C. jejuni* や *C. coli* などのカンピロバクター属菌が混在している可能性も考慮しなければならない。37~42°C で選択分離培地を培養すると、*C. jejuni* や *C. coli* に比べ発育の遅い Cff の分離は困難となる。そこで、*C. jejuni* や *C. coli* 等の高温性カンピロバ

クター (いわゆる Thermophilic *Campylobacter*) の影響を受けず、Cff の発育が可能な選択分離培地の培養温度を検討した結果、30°C が適していると考えられた。

一方、増菌培地中の Cff 菌数を培養温度別に定量したところ、30°C、48 時間の培養で、6 株中 5 株は 10^3 cfu/mL 以上に増加したが、残りの 1 株 (HP9330) は検出限界以下であった。また、培養時間を 72 時間まで延ばすことで、48 時間では検出されなかった株も検出可能となったが、培養液中の菌数は 10^2 cfu/mL とわずかな増加に止まった。次に、培養温度を 37°C に設定したところ、24 時間培養における菌数は検出限界以下であったが、48 時間培養後では、すべての供試株の菌数は、 10^4 cfu/mL 以上となった。以上のことから、増菌培養の温度を 37°C とし、増菌液中の菌を十分増殖させ、選択分離培地の培養温度によって夾雑菌 (*C. jejuni*, *C. coli* は Cff にとって発育を妨げる菌) を制御する方法が、検査の迅速性、検出感度の両面からも良いと考えられた。すなわち、Cff の増菌培養には、Bolton 培地を用い、37°C、48 時間培養が適当であることが示唆

Table 5. Inoculation experiment of Cff to beef liver

Inoculum amount (CFU/25g)	No. of Cff* in Bolton broth after culturing at 37°C for 48h (CFU/mL)	Growth on a plate (Cff / Others)	
		30°C	37°C
1.8×10^2 (Low)	1.4×10^4	+ / ++	± / +++
1.8×10^3 (Medium)	1.6×10^4	+ / ++	± / +++
1.8×10^4 (High)	1.4×10^5	+ / ++	± / +++

*Detection by real-time PCR (CFU/mL)

No. of colonies on a plate: +; ≤ 10 , ++; 10^2 , +++; $\geq 10^3$, ±; Indistinguishable, -; No growth

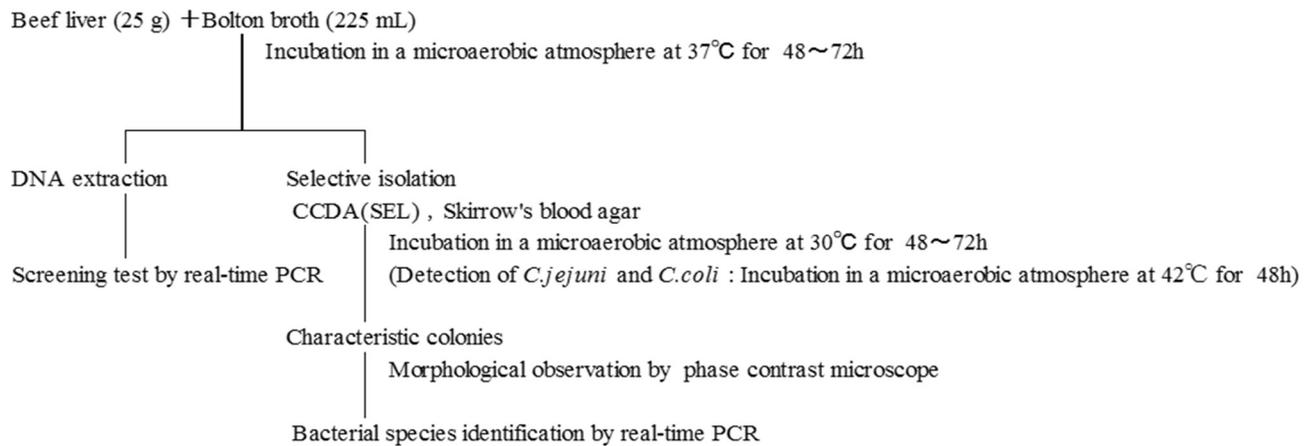


Fig.3. Procedure to detect Cff in beef liver

された。また、分離培地を、30°C、48~72時間微好気培養することにより、*Thermophilic Campylobacter*の影響を抑え、Cffを容易に分離することが可能となった。

牛肝臓への接種試験では、Bolton増菌培地で37°C 48時間培養後、リアルタイムPCRにてCffの菌数が 10^4 cfu/mLに増加したことが確認された。なお、今回行った検討ではBolton増菌培養液量を225mLに設定したが、多数検体の検査を考慮すると、今後、培養系の少量化の検討なども必要であろう。

なお、データを示していないがCff下痢症患者の糞便検体を用いて、牛肝臓と同じ条件（Bolton増菌培地、CCDA（SEL））での検査法を検討した結果、Cffの検出が可能であった。なお、菌株毎の発育速度の違いを考慮し、選択分離培地の培養時間は37°C、48時間で判定後、さらに72時間後まで培養し、最終判定をすることが望ましいと考えられた。今回の検討結果を踏まえて、食中毒発生時のCff検査法をFig. 3に示した。Cff食中毒発生時には、原因究明に本検査法を活用していきたい。

文 献

- 1) 藪内英子：医学のあゆみ，**111**. 838-844. 1979.
- 2) 品川邦汎：獣医畜産新報，**60**. 895-899. 2007.
- 3) Florence, S., Damien, L., D., Anne-Laure, *et al.*: *J. Clin. Microbiol.* **51**. 3147-3150. 2013.
- 4) Ishihara, A., Hashimoto, E., Ishioka, H., *et al.*: *IDCcases.* **11**. 97-100. 2018.
- 5) 市之宮健二，井上文孝，井上貴博，他：日周産期・新生児会誌，**47**. 113-118. 2011.
- 6) 中村幸嗣，宮地悠輔，鶴岡純一郎，他：小児感染免疫，**22**. 357-361. 2010.
- 7) 厚生労働省食中毒統計資料，
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (2020年8月20日

現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

- 8) 沓木力晴：牛肝臓におけるカンピロバクターの危害評価に関する研究，平成13年度厚生科学研究分担研究報告書。2003.
- 9) 根本 久，中沢宗生：日獣会誌，**32**. 461-465. 1979.
- 10) George, H.A., Hoffman, P.S., Smibert, R.M., *et al.*: *J Clin Microbiol.* **8**. 36-41. 1978.
- 11) Abril, C., Vilei, E.M., Brodard, I., *et al.*: *Clin Microbiol Infect.* **13**. 993-1000. 2007.
- 12) 横山敬子：東京健安研七年报，**68**. 13-24. 2017.

The Detection of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* in Beef Liver

Keiko YOKOYAMA^a, Satoru AKASE^a, Masaki TAKAHASHI^a, and Kenji SADAMASU^a

Campylobacter fetus subsp. *fetus* (Cff) causes various diseases, such as sepsis, meningitis, and diarrhea, in humans. Raw beef liver has been suggested as a cause of *C. fetus* infections in humans, but there is no standardized test for Cff in food products. In this study, we examined a method that tests for Cff in beef livers with a straightforward isolation of *C. fetus*. After incubating raw beef liver in the CCDA (SEL), Skirrow, or Bolton growth medium under a microaerobic condition at 37°C for 48 hours, the different media was smeared on plates to incubate at 30°C for 48 to 72 hours in microaerobic conditions. We designed a set of primers for real-time PCR to differentiate Cff from *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (Cfv). Furthermore, it was possible to detect Cff and *C. jejuni* and *C. coli* in the same specimens by incubating the selective plating medium at two temperatures, 30°C and 42°C. These data suggest the method examined here is an efficient method for testing food poisoning.

Keywords: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, culture method, beef liver, food poisoning, real-time PCR

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