

鶏肉からのカンピロバクターの定量および定性検査法の有効性評価

石村 勝之 吉野谷 進 下村 佳¹ 古田 喜美²
谷口 正昭 豊島 隆之¹ 笠間 良雄 松本 勝

本邦のカンピロバクター食中毒のリスクアセスメントを行うためには、標準化された信頼性の高い定量あるいは定性検査法の確立が必要とされている。今回、標準化に向けての協力研究として、気密性袋を使用した好気培養法の有効性について、増菌培地希釈倍率の影響および微好気培養法との比較検討を行った。

気密性袋を用いた好気培養法において、大量培養法は×5希釈で80%(8/10), ×10希釈で60%(6/10)の陽性率を示し、MPN法は×5希釈で90%(9/10), ×10希釈で100%(10/10)と高率に本菌を検出できた。微好気培養と好気培養のMPN定量性の比較では、×5希釈では、微好気培養が高MPN値を示す割合が高かった。一方、×10希釈では、好気培養の方が高MPN値を示す割合が高かった。

以上の結果、気密性袋を使用した好気培養法は、定性的には大量培養およびMPN法とも微好気培養法と同等の検出率がみられることから、本菌の培養検出に使用できると考えられた。一方、MPN法による定量についても有効性が示唆された。希釈倍率および好気・微好気の培養条件による検出能の詳細については、さらに検討が必要と考えられた。

キーワード： カンピロバクター、鶏肉、培養検査法、標準化、気密性袋

はじめに

鶏肉からのカンピロバクター分離においては、検査方法の違いにより検出率が大きく異なることが指摘されている。わが国では、現在必ずしも統一的に普及した標準的検査法が確立していないことから、生産から消費段階までの本菌のリスクアセスメントに必要な信頼性の高い定量および定性データが得られる標準的検査法が必要とされている。

このため、現在、国立医薬品食品衛生研究所が主体となってカンピロバクター培養検査法の標準化に向けての検討が進められており、この課題へ当所生物科学部も研究協力している。今回は、気密性袋を使用した好気培養法と微好気培養法を比較し、その有効性の評価検討を行ったので報告する。

方 法

1 試料

平成17年7月～12月に採取した下記試料計26検体を供試した。

- (1) 試験：スーパー等で店頭購入したパック詰鶏皮付モモ肉10検体
- (2) 調査：収去鶏皮付モモ肉16検体(食肉処理業および食肉販売業で合成樹脂製袋詰原料(未開封品)から無菌的に採取したもの)

2 方法

(1) 比較試験

研究班統一の方法により実施した。

鶏皮付モモ肉試料を気密性袋2袋に25gずつ採取し、Preston培地(Oxoid)100mlおよび225mlを加えて30秒間ストマッキングし、均一化した。(×5希釈液および×10希釈液の調製)

各希釈液について、10mlを6本の空試験管、1ml、0.1mlを各6本のPreston培地10ml加試験管に接種し、各系列3本計9本を42℃、24時間、キャンピーパック(BD)による微好気培養法と国立医薬品食品衛生研究所から提供された気密性袋による密封培養(好気培養法)により増菌培養した。

*1：現 社会局保健部食品保健課

*2：現 社会局保健部食肉衛生検査所

その培養液から定量白金耳で一白金耳(10 μ L)をmCCDA 培地(Oxoid)1枚に塗布し, 42 , 48 時間微好気培養し, カンピロバクターの発育した陽性本数から MPN 値を求めた。

大量培養は, 上記で試験管に分注した残液袋をできる限り空気を除き, シーラーで密封後, 同様に好気培養し, 以下 MPN 法と同様に分離培養を行った。同定は, 定法に従い鏡検による形態観察, 馬尿酸加水分解試験等を行った。

(2) 調査

収去した鶏皮付モモ肉の試料 25g を気密性袋に採取し, Preston 培地 100ml にて 5 倍希釈し, 試験と同様に分注した試験管各 9 本を微好気および好気培養するとともに, シールした残液袋を好気大量培養後 分離培地として mCCDA および Butzler 培地(BD)を用いて MPN 定量法および定性試験結果を比較した。

結 果

1 比較試験

比較試験の結果を表 1 に示した。

(1) 大量培養法

気密性袋を用いた好気培養法による大量培養では, $\times 5$ 希釈試料で 80% (8/10), $\times 10$ 希釈試料で 60% (6/10) の陽性率であった。

(2) MPN 定量法

$\times 5$ 希釈試料の微好気培養による MPN 値は $<15 \sim >5500$ MPN/100g (9/10), 好気培養では $<15 \sim 2300$ MPN/100g (9/10) であった。微好気培養および好気培養の MPN 値比較では, 微好気培養の方が高 MPN 値を示す割合が高かった (8/10)。

$\times 10$ 希釈試料の微好気培養法による MPN 値は $<30 \sim 4600$ MPN/100g (9/10), 好気培養法では 36~11000 MPN/100g (10/10) であった。微好気培養および好気培養の MPN 値比較では, 好気培養が高 MPN 値を示す割合が高かった (7/10)。

2 調査

調査の結果を表 2 に示した。

(1) 大量培養法

$\times 5$ 希釈試料による大量培養(好気培養法)では, mCCDA 培地で陽性率 50% (8/16), Butzler 培地で 44% (7/16) を示した。

(2) MPN 定量法

$\times 5$ 希釈試料による MPN 法(微好気培養法)では, mCCDA 培地, Butzler 培地とも陽性率 81% (13/16) を示し, MPN 値は $<15 \sim >5500$ MPN/100g

であった。

$\times 5$ 希釈試料による MPN 法(好気培養法)では, mCCDA 培地で陽性率 69% (11/16), Butzler 培地で 65% (10/16) を示し, MPN 値は $<15 \sim >5500$ MPN/100g であった。

微好気および好気培養法の MPN 定量値の比較では, 微好気培養法が高値あるいは同値を示すものが 81% (13/16) であった。一方, 好気培養法は 50% (8/16) であり, 微好気培養法の方が同値以上を示す割合が高かった。

考 察

カンピロバクターの分離培養には, 本菌が微好気性菌であることから, その培養のための設備が必要なことがコストやスペースの面で障害となっている。今回の比較試験では, 国立医薬品食品衛生研究所で確認されている気密性袋の有効性を複数の機関で確認することが目的の一つであった。当所での試験および調査結果からも, 気密性袋を用いた好気培養による大量培養法や MPN 法による定量培養法で, 高率にカンピロバクターが検出できたことから, 本袋を使用することによって, 必ずしも微好気培養を行うための設備がなくとも Preston 増菌培地中のカンピロバクターの増殖が可能であり, 分離培地の段階のみ微好気培養すれば分離が可能であることが追認された。

一方, 培地希釈率に関しては, 検体量に対して増菌培地 9 倍量を加えることが必要とされるが, 今回の検討では $\times 5$ 希釈を用いた気密性袋による大量培養法は $\times 10$ 希釈と同等以上の陽性率を示し, $\times 5$ 希釈液を用いた MPN 法は, 微好気および好気培養とも $\times 10$ 希釈液と同等の陽性率および MPN 値を示した。この結果から, $\times 5$ 希釈による大量培養法は, $\times 10$ 希釈を用いた基本的な培養方法と同様にカンピロバクター定性検査に使用可能と考えられた。一方, 気密性袋を用いた $\times 5$ 希釈による MPN 定量法は, 大量培養法と比較して同等以上の検出率を示したことから, 操作作業は定性法に比べると煩雑なもの, カンピロバクターの定量値が得られるとともに, 定性法と比較して必要培地量が大幅に削減できる可能性があることなど, 大きなコスト面でのメリットも考えられることから, 定性法としての有用性も示唆された。

MPN 法による定量値の比較では, $\times 5$ 希釈での微好気培養による MPN 法は, 好気培養法による MPN 法より高 MPN 値を示す割合が高く, $\times 10$ 希

表1 鶏肉の希釈倍率・培養条件・培養方法別比較試験結果

希釈倍率(増菌培地)		× 5 希釈(Preston 培地)			× 10 希釈(Preston 培地)		
培養条件		微好気	好気	好気	微好気	好気	好気
培養方法		MPN 法*1	MPN 法	大量培養	MPN 法	MPN 法	大量培養
1	国産チルド	18	<15		<30	36	
2	国産チルド	<15	18		92	36	
3	国産チルド	1200	1200	+	230	750	+
4	国産チルド	46	18	+	92	92	+
5	国産チルド	1200	345	+	230	430	+
6	国産チルド	1200	1200	+	230	2400	+
7	国産チルド	215	215	+	230	92	
8	国産チルド	2300	2300	+	430	230	
9	国産チルド	190	465	+	230	1500	+
10	国産チルド	>5500	1200	+	4600	11000	+
陽性数/検体数(%)		9/10(90)	9/10(90)	8/10(80)	9/10(90)	10/10(100)	6/10(60)

*1: 数値は 100gあたりの値

表2 調査結果

希釈倍率(増菌培地)		× 5 希釈(Preston 培地)					
培養条件		微好気	好気	好気	微好気	好気	好気
培養方法		MPN 法	MPN 法	大量培養	MPN 法	MPN 法	大量培養
分離培地		mCCDA 培地			Butzler 培地		
11	国産チルド	1200	31	+	1200	15	+
12	国産チルド	215	2300	+	215	750	
13	国産チルド	1200	105	+	465	36	
14	国産チルド	37	18		215	18	+
15	国産チルド	2300	1050	+	2300	465	+
16	国産チルド	465	115		105	46	
17	国産チルド	18	175		18	105	
18	国産チルド	<15	<15		<15	<15	
19	国産チルド	<15	<15		<15	<15	
20	国産チルド	>5500	>5500	+	>5500	>5500	+
21	国産チルド	46	<15		46	<15	
22	国産チルド	<15	<15	+	<15	<15	+
23	国産チルド	>5500	>5500	+	>5500	2300	+
24	国産チルド	46	47		15	<15	
25	国産チルド	46	18	+	215	46	+
26	国産チルド	18	<15		46	<15	
陽性数/検体数(%)		13/16(81.3)	11/16(68.8)	8/16(50.0)	13/16(81.3)	10/16(62.5)	7/16(43.8)

釈の MPN 法では逆の傾向がみられたことから、希釈倍率と微好気および好気培養間での MPN 値に関する差異傾向についてはさらに検討が必要と考えられるが、その MPN 値は 95% 信頼限界の下限および上限域に亘りオーバーラップするもの

も多かったことから、気密性袋を用いた MPN 定量検査法の有用性も示唆された。

本研究は、17 年度厚生労働科学研究費補助金・食品の安全・安心確保推進研究事業への協力研究として実施した。