

## 鶏肉のカンピロバクター培養検査法の検討

### -鶏肉の検査方法別検出感度および検出率の比較-

国井 悦子 下村 佳 古田 喜美 河本 秀一\*  
石村 勝之 吉野谷 進 谷口 正昭 萱島 隆之  
笠間 良雄 松本 勝 荻野 武雄

信頼性の高いカンピロバクター培養検査方法を検討するために *Campylobacter jejuni* を接種した鶏肉を用いて、Preston 培地、Bolton 培地、および mCCDA 培地を使用を基本とした試験管法、大量培養法、および遠心分離法の検出感度を調べるとともに実試料における試験管法および大量培養法の検出率を比較した。その結果、検出感度は、試験管法 5.0 cfu/g、遠心分離法 1.0 cfu/g、大量培養法 1.2 cfu/g 以下を示し、大きな差異は認めなかった。しかし一方、実試料からの検出では、夏期に食肉処理業で採取した国産チルド鶏肉は試験管法および大量培養法とも 85% および 94% の高い検出率を示したが、秋期に採取したチルド鶏肉では、試験管法 33%、大量培養法 58% を示し、夏期に比べ半減するとともに、検査方法間にも顕著な差が認められた。輸入冷凍鶏肉は、国産チルド鶏肉より検出率が低く、試験管法ではほぼ検出されず、大量培養法で 29% 検出された。以上の結果から、夏期は、汚染菌数が 5.0 cfu/g レベルを超える検体の割合が高く、試験管法も大量培養法と同様の検出率が認められたが、秋期は汚染菌数が 5.0 cfu/g を下回る検体が増え、大量培養法と差異が生じたことが示唆された。

キーワード：カンピロバクター、鶏肉、大量培養法、試験管法、遠心分離法

#### はじめに

カンピロバクターは、世界的に細菌性下痢症原因菌の上位にランクされ、その主原因としての鶏および鶏肉の汚染制御が課題となっている<sup>1)</sup>。本菌は、微好気性で発育し、酸素濃度が高い環境や凍結・乾燥などにより損傷・死滅しやすい性質がある。しかし、それらの条件下での菌の挙動は詳しくは解明されていないことから、現在も食品や環境中での生存状態、生残様式に関して十分な知見が得られていない。従って、カンピロバクター下痢症の感染源としての評価が十分には行えていない。一方、わが国では、標準的な検査方法が必ずしも確立していないことから、全国的な実態について比較できるデータの蓄積が十分ではない。従って、検査方法を確立し、標準化した検査法に基づいた調査が広範囲になされる必要がある。今回、検査法を検討していくための基礎資料として、カンピロバクターを接種した鶏肉モデルによる感

\*：現 社会局保健部食品保健課

度試験と3種類の培養検査方法を検討したので報告する。

#### 方 法

##### 1 接種試験使用菌株

接種菌として患者糞便由来のエリスロマイシン (EM) 耐性 *C. jejuni* 03183 株を用いた。

##### 2 接種試験方法

*C. jejuni* 03183 株をトリプトソイブイオンに接種し、一夜培養した後、生理食塩水で希釈し、約  $10^0 \sim 10^1$  cfu/g レベルになるようにチルド流通鶏もも肉に接種した。それを 4 に 1 時間静置した後、図 1 に示した 3 方法 (遠心分離法 試験管法 大量培養法) により接種菌の分離を行った。同一濃度の EM 耐性 *C. jejuni* 03183 株菌液を接種した鶏肉 3 検体を調製し、同時に対照として無接種鶏肉を加えた 4 検体を 1 系列として試験した。

なお、試験管法については、手もみによる検体処理を加え検討した。使用培地は、増菌培地として

Preston 培地(OXOID)および Bolton 培地(OXOID), 選択分離培地として mCCDA 寒天培地(OXOID)および Butzler 寒天培地(OXOID)を用いた。なお, 両寒天培地には, EM 感受性菌を抑制し, 接種菌を検出する目的から, 予備検討を行い, C.jejuni 03183 株の発育が抑制されないと考えられた濃度 10 μg/ml に EM を加え使用した。

3 供試鶏肉および検査方法

平成 16 年 7~11 月までに, 保健所が広島市内の食肉処理業および食肉販売業者から採取した袋詰包装のチルドまたは冷凍鶏もも肉を検査対象とした。

夏期(7・8 月)は, 国産チルド鶏肉 17 検体, 輸入冷凍鶏肉 5 検体を, 秋期(10・11 月)は, 国産チルド鶏肉 19 検体, 輸入冷凍鶏肉 14 検体計 55 検体を採取した。

検査方法は, 図 1 に示した試験管法および大量培養法により行った。

結 果

1 接種試験

(1) 接種菌数

接種菌数は, 菌液の菌数, 菌液量および鶏肉重量から, 0.2, 1.0, 1.2, 5.0, 16.8, および 84.0 cfu/g と計算された。

(2) 試験管法

接種菌数 1.2cfu/g では, 手もみで乳剤化を行うほうが若干, 収率がよく, Bolton 培地 2 日間増菌 2 日間分離培養が 3 検体中 2 検体回収できた。一方, Preston 培地では, 1 日間増菌, 1 日間分離培養でほぼ 10<sup>1</sup> cfu/g 以上の検出感度を示した。5.0cfu/g では, 乳剤化方法による差異は認められなかった。Preston および Bolton 培地ともに 1 日間増菌では 2~3 日の分離培養が必要であったが, 2 日間増菌では 1 日間分離培養でコロニーが認められた。mCCDA と Butzler 寒天培地に明瞭な検出能の差は認められなかった(表 1)。

(3) 大量培養法

接種菌数 1.2cfu/g 以上で, すべて 1 日間増菌 1 日間分離培養でコロニーが確認できた(表 2)。

(4) 遠心分離法

接種菌数 0.2cfu/g では, 陽性検体は, 1 日間増菌培養および 2 日間増菌培養とも 3 検体中 1 検体と低かった。1.0 cfu/g では, Bolton 培地 1 日間増菌 1 日間分離培養で 3 検体ともコロニーが認められた。16.8 cfu/g, 84.0 cfu/g では, Preston 培地, Bolton 培地ともに 1 日間増菌 1 日間分離培養で 3 検体とも回収できた。mCCDA と Butzler 寒天培地の差は認められなかった(表 3)。

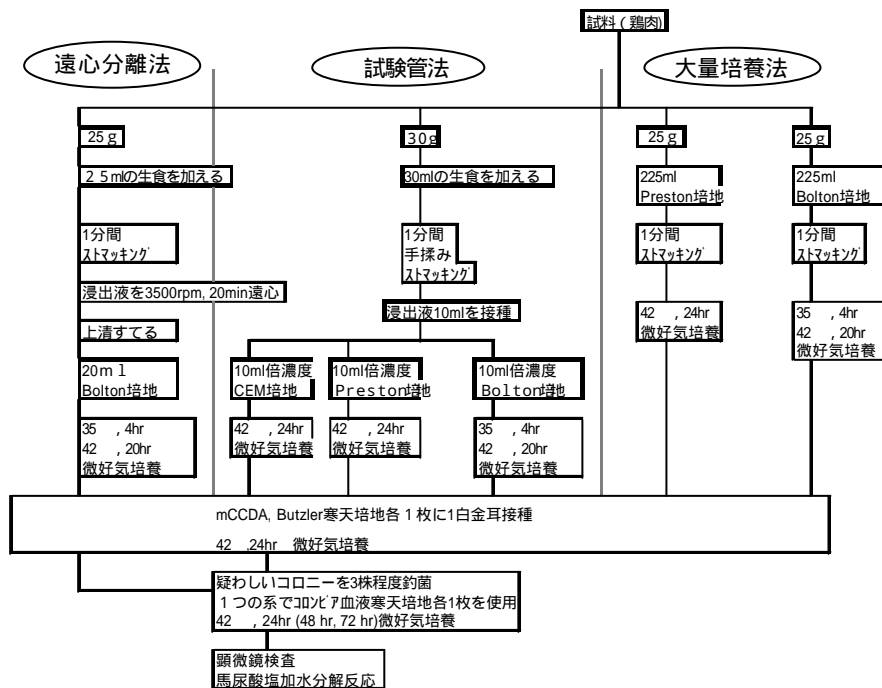


図 1 鶏肉からのカンピロバクター培養方法

表1 試験管法の感度試験結果

処理方法	接種菌数	増菌日数	検体No.	試験結果					
				X2 CEM		X2 Preston		X2 Bolton	
				mCCDA	Butzler	mCCDA	Butzler	mCCDA	Butzler
ストマッカー	1.2 cfu/g	1	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
		対照	-	-	-	-	-	-	
		2	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	-	-	
	5.0 cfu/g	1	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
		2	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
3			-	-	-	-	-	-	
手もみ	1.2 cfu/g	1	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
		2	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
	5.0 cfu/g	1	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
		2	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-

X2: 2倍濃度  
 NT: not tested  
 :1日目コロニー形成; :2日目コロニー形成; :3日目コロニー形成

2 実試料の培養法別検出率の比較

実試料からの検出では、夏期に採取した国産チルド鶏肉は、試験管法および大量培養法で各々最高で 85%および 94%の高いカンピロバクター検出率を示した。一方、秋期採取チルド鶏肉では、

試験管法 33%、大量培養法 58%を示し、夏期に比べて半減するとともに、培養方法間にも顕著な差が認められた。輸入冷凍鶏肉は、全体として国産チルド鶏肉より検出率が低く、試験管法では1検体からのみ検出され、大量培養法では29%から検出された。

表2 大量培養法の感度試験結果

処理方法	増菌日数	接種菌数	検体No.	培養結果			
				Preston		Bolton	
				mCCDA	Butzler	mCCDA	Butzler
ST	1	1.2 cfu/g	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
		5.0 cfu/g	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
	16.8 cfu/g	1	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
		84.0 cfu/g	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-

ST: ストマッカー30秒  
 : 1日目コロニー形成  
 NT: not tested

考 察

近年、欧米諸国と同様に、わが国においてもカンピロバクターを原因とする食中毒や腸炎が増加傾向にあり、その予防対策が重要になっている。広島市においても散発性食中毒の原因菌として本菌は主要な位置を占めている<sup>2)</sup>。それらの原因として、生や加熱不十分な鶏肉が関与したと考えられる事例が多く認められることから、鶏ならびに鶏肉のカンピロバクター制御が、本菌による食性被害の減少に大きく寄与すると考えられる<sup>3)</sup>。

**表3 遠心分離法の感度試験結果**

処理方法	接種菌数	増菌 日数	検体 No.	培養結果			
				Preston		Bolton	
				mCCDA	Butzler	mCCDA	Butzler
0.2 cfu/g	1	1	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
		対照	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
	2	1	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
		対照	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
ST 1.0 cfu/g	1	1	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
		対照	1	-	-	NT	NT
			2	-	-	NT	NT
			3	-	-	NT	NT
	2	1	1	NT	-	NT	NT
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
		対照	1	-	-	-	-
			2	-	-	-	-
			3	-	-	-	-
16.8 cfu/g	1	1	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	
	対照	1	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	
84.0 cfu/g	1	1	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	
	対照	1	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	

ST: ストマツカ-30秒  
: 1日目コロニー形成  
NT: not tested

本菌への予防対策を効果的に行うには、できる限り正確な汚染実態を、鶏や鶏肉、あるいは鶏肉加工品などについて把握する必要があるが、わが

国では必ずしも検査方法が統一されていないことから、相互比較可能な疫学的データが乏しいのが現状である。当所では、増菌培地として CEM 培地を長く使用しているが、今回、本培地に加え、国際的に最も汎用されている Preston 培地、Bolton 培地および mCCDA 培地を使用した 3 種類の検査方法を検討した。

検体 25g に培地 225ml を使用する大量培養法は、国際的に最も基本的なカンピロバクター検査方法である。しかし、必要とする培地量が多くコストがかかること、また、検査に必要な容積が大きくなることから微好気培養のための機器、機材も多く必要となり、培養に要するスペースを広くとるなど、多検体の同時検査が困難であるという欠点があり、このことが本法がわが国で現在も普及していない大きな要因のひとつと考えられる。

そこで操作が簡易であり、必要とする培地量が少なく、かつ比較的高い検出感度を維持した検査方法を検討するため、今回、試験管法<sup>4)</sup>および遠心分離法<sup>5)6)</sup>について比較試験を行った。その結果、供試した EM 耐性 C.jejuni 株において、検出感度として試験管法 5.0 cfu/g、大量培養法 1.2 cfu/g 以下、遠心分離法 1.0 cfu/g を示し、大量培養法が

表4 鶏肉の採取時期・種類・培養法・培地別検出比較

採取時期	種類	培養法・増菌培地	陽性数/検体数 (%)	
			mCCDA	Butzler
夏期(7~8月)	国産・チルド	試験管法・×2 CEM	11/13(84.6)	11/17(64.7)
		大量培養法・Preston	16/17(94.1)	11/17(64.7)
		大量培養法・Bolton	10/17(58.8)	13/17(76.5)
	輸入・冷凍	試験管法・×2 CEM	0/4(0)	1/5(20)
		大量培養法・Preston	1/5(20)	1/5(20)
		大量培養法・Bolton	1/5(20)	0/5(0)
秋期(10~11月)	国産・チルド	試験管法・×2 CEM	4/18(22.2)	4/18(22.2)
		試験管法・×2 Preston	6/19(31.6)	6/19(31.6)
		試験管法・×2 Bolton	6/18(33.3)	5/19(26.3)
		大量培養法・Preston	11/19(57.9)	7/19(36.8)
		大量培養法・Bolton	11/19(57.9)	10/19(52.6)
	輸入・冷凍	試験管法・×2 CEM	1/14(7.1)	1/14(7.1)
		試験管法・×2 Preston	0/14(0)	0/14(0)
		試験管法・×2 Bolton	0/14(0)	0/14(0)
		大量培養法・Preston	4/14(28.6)	3/14(21.4)
		大量培養法・Bolton	4/14(28.6)	3/14(21.4)

×2: 2倍濃度

最も高い感度を示すと考えられたが、他の2法もさほど大きな差異は認められなかった。大量培養法に比べ、遠心分離法は、遠心分離器が必要であるが、増菌培地量が約10分の1と少なくすみ、Bolton培地1日間増菌1日間分離培養で、1.0cfu/gの菌量が回収できたことから、本試験法も培地コストおよび感度とも有用と考えられた。

分離培地の検討では、mCCDAとButzler寒天培地に顕著な差はみられなかった。ただし、試験管法の1.2cfu/g接種において、分離培地のどちらか一方に接種菌が回収されたことから、汚染菌が少量の場合を想定すると両培地の併用が望ましい。

実試料への適用においては、夏期は、試験管法および大量培養法とも高い検出率を示し、試験管法の有用性が示唆されたが、秋期は、両方法とも検出率が半減し、しかも試験管法の検出率が大きく低下した。この減少の原因は不明であるが、北欧ではプロイラーの保菌率が季節的に変動することが認められており、また汚染菌量の季節的な増減を認めた報告<sup>8)</sup>もある。本邦においても、このような季節の変動が存在し、それが検出率に影響しているのかもしれない。仮に鶏肉の汚染率や汚染菌数の分布に季節的な変動が存在すると、最終的なヒトへの感染機会も増減する<sup>1)</sup>ことが想定される。広島市内の患者届出は年間を通じてあるが、夏期に多く、秋期は減少する傾向が本市の食中毒統計で認められる。このような課題を全国的な視点で検討するためにも、検査法の標準化が不可欠である。

今回検討した3検査法は、実際のチルド鶏肉を汚染しているカンピロバクターの汚染菌数が高い場合はどの培養方法も有用と考えられるが、菌数が低い場合は検出できない場合があり、特に試験管法は有効性が低下すると考えられ、なんらかの改良が必要と考えられた。一方、実態の把握については、リスクアセスメントの観点から定量法により行うことが望まれる。今回検討した培地への一種類の菌株の接種試験では、計算上試験管に約25 cfuの菌が接種されないと培養陽性にならない結果であった。この結果は接種菌が異なると変化する可能性があるものの、これらの培地を用いてMPN法で定量した際には、実際の食品中の菌数を過小評価する可能性があることを示唆することから、今後、検討が必要である。いずれにしても、カンピロバクター検査法として、どのレベルの汚染菌数を検出できれば、本菌感染症の感染機会を

減らすことに貢献できるのか、また、それを達成する検査法が費用・労力的に現実性があるのかなど、費用対効果を勘案して感度、検査コンセプトを定める必要がある。それにより、わが国の標準化検査法の方向性が定まっていくものと思われる。

他方、冷凍下に置かれた鶏肉中ではカンピロバクター菌数が減少することが知られている<sup>9)10)</sup>が、もうひとつの課題として、冷凍鶏肉中でのカンピロバクターの生理状態についてより詳細な情報が必要である。凍結状態で鶏肉を汚染しているカンピロバクターの感染能力について検討が必要である。そのためには、今後、種々の環境下でのカンピロバクターの生理状態と増殖能、病原性に関する基礎的機構が解明される必要がある。その上で、可能な場合は適切な培養方法が検討、開発されることが望まれる。

この研究の一部は平成16年度厚生労働科学研究・食品の安全性高度化推進研究事業「細菌性食中毒の予防に関する研究」の協力研究として行った。

## 文 献

- 1) Rosenquist H et al: Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic Campylobacter species in chickens, *Int J Food Microbiol*, 83, 87~103(2003)
- 2) 石村勝之 他: 広島市の散発性カンピロバクター食中毒における分離菌株の疫学的解析手法と解析結果の検討, *広島市衛研年報* 21, 41~46(2002)
- 3) 東京都食品安全情報評価委員会: カンピロバクター食中毒の発生を低減させるために-正しい理解でおいしく食べる-, <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/zen/hyouka/houkoku/report2.html> (2004)
- 4) 藤井慶樹 他: 検査法による鶏肉のカンピロバクター検出率の相違について, *食品衛生研究*, 55, 33~36(2005)
- 5) 小笠原美香 他: カンピロバクターの食品、環境からの効果的な分離方法と汚染状況ならびに鶏肉中での挙動について, *HACCP*, 83, 57~60(2002)
- 6) Tangvantcharin P et al: Comparison of methods for the isolation of thermotolerant Campylobac-

- ter from poltry ,J Food Protect ,68 ,616 ~ 620(2005)
- 7) Hofshagen M et al: Reduction in flock prevalence of Campylobacter spp. in broilers in Norway after implementation of an action plan , J Food Protect ,68 ,2220 ~ 2223(2005)
- 8) Wallace JS: Seasonality of thermophilic Campylobacter populations in chickens , JAppl Microbiol ,82 ,219 ~ 224(1997)
- 9) Sandberg M et al: Survival of Campylobacter on frozen broiler carcasses as a function of time ,J Food Protect ,68 ,1600 ~ 1605(2005)
- 10) 小野一晃 他 : 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 , 日食微誌 , 22 , 59 ~ 65(2005)