

＝原 著＝

## 二段階増菌による輸入鶏肉からの カンピロバクター分離法の検討

小野一晃<sup>†</sup>・安藤陽子・柳川敬子・中川俊夫

(埼玉県衛生研究所)

(受付 平成 19 年 7 月 17 日)

(受理 平成 19 年 9 月 11 日)

## Two-stage Enrichment Method for Isolating *Campylobacter* spp. in Imported Chicken Samples

Kazuaki ONO<sup>†</sup>, Yoko ANDO, Keiko YANAGAWA  
and Toshio NAKAGAWA

(Saitama Institute of Public Health, 639-1 Kamiokubo, Sakura-ku,  
Saitama-shi, Saitama 338-0824; <sup>†</sup> Corresponding author)

We investigated the *Campylobacter* isolation method from retail imported chicken samples. *Campylobacter* spp. was isolated from 26 of 100 samples (26.0%) using Preston enrichment broth, whereas 13 of 100 samples (13.0%) using Bolton broth. It is suggested that Bolton broth is not suitable for the isolation of *Campylobacter* spp. when meat remains in the culture medium, because of its weakness in sustaining the growth of other bacterium. Isolation rate of *Campylobacter* spp. was increased ( $p < 0.05$ ) to 42.0% when 1 ml of Preston culture medium was inoculated to another sample of Preston broth (10 ml) after incubation for 24 hours, and similarly, isolation rate was raised ( $p < 0.05$ ) to 33.0% when 1 ml of Bolton culture medium was inoculated to Preston broth. Two-stage enrichment that is inoculation of Bolton culture medium to Preston broth following pre-incubation (for 24 hours) of whole emulsion samples, is useful for frozen chicken samples, such as imported chickens, in which the bacterial number of *Campylobacter* spp. is supposed to be reduced during the process of freezing or thawing.

**Key words:** *Campylobacter* spp., Imported chicken, Two-stage enrichment

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) はヒトの下痢症の起因菌とされ、近年、わが国でも欧米諸国と同様に<sup>4)</sup>、本菌による食中毒事例が増加する傾向にある<sup>7)</sup>。

本菌による食中毒は、例年その 8~9 割が原因食品不明 (厚生労働省ホームページ: 全国食中毒発生状況) であるが、その理由の一つに、凍結・解凍によって菌が損傷あるいは死滅し、冷凍保存された食品 (保存食) からの菌分離が困難であることが挙げられる。

われわれは過去に冷蔵状態で販売されていた国産鶏肉と、冷凍状態で販売されていた輸入鶏肉についてカンピロバクターの汚染状況を調査し、輸入品は国産品に比べ

汚染率・汚染菌数とも低い値であることを報告した<sup>10)</sup>。

凍結された食品など損傷菌を対象とした増菌培養法として、増菌培養液を 37℃、4 時間で前培養後、温度を 42℃ にシフトしてさらに 1~2 日間培養を行う方法が推奨されている<sup>9)</sup>。しかし本法では培養途中で温度を変更するために作業が繁雑になってしまう。

そこで、汚染菌数が少ないことが想定される冷凍鶏肉からの有効な菌分離法を検討する目的で、検体の乳剤全量を増菌培養し (前増菌)、24 時間後に培養液の一部を新しい培地に接種し再度培養を行う (後増菌) 二段階増菌法について検討したので報告する。

<sup>†</sup> 連絡先

☎338-0824 さいたま市桜区上大久保 639-1

## 材料および方法

### I. 供試材料

平成 18 年 1 月から平成 19 年 1 月にかけて、県内の小売店（6 店舗）において冷凍状態で販売されていた輸入鶏肉（ブラジル産 94 検体，アメリカ産 5 検体，チリ産 1 検体）計 100 検体を購入し，検査に供した。

### II. カンピロバクター分離法

#### 1. 定性試験および MPN 法による定量試験

鶏肉 25 g を①Preston 培地<sup>2)</sup> [ニュートリエントブイオン No. 2 (Oxoid) にプレストンカンピロバクター選択サプリメント (Oxoid) とカンピロバクター発育サプリメント (Oxoid) を添加し，5%量の馬脱線維血液（日本バイオテスト研究所）を加えたもの]，および②Bolton 培地<sup>5)</sup> [ボルトンブイオン (Oxoid) にボルトンカンピロバクター選択サプリメント (Oxoid) を添加し，5%量の馬脱線維血液を加えたもの] の 2 種類の増菌培地 100 ml にそれぞれ加え，約 1 分間ストマッカー処理して 5 倍乳剤を作製した。この乳剤を用いて常法<sup>5)</sup>に基づき MPN（3 管）法による定量試験を，さらに，残りの乳剤全量はそのまま増菌培養し，定性試験を行った。

MPN（3 管）法による菌数測定については以下に示す。作製した 5 倍乳剤 10 ml を 3 本の空の滅菌試験管に，また，乳剤 1 ml，0.1 ml を 10 ml の増菌培地（Preston 培地と Bolton 培地の 2 種類）の入った試験管 3 本ずつにそれぞれ接種した。この際，Preston 培地を用いたサンプルは 42°C，48 時間，Bolton 培地を用いたサンプルは 37°C，4 時間，その後 42°C，44 時間，いずれも微好気状態（O<sub>2</sub>: 5%，CO<sub>2</sub>: 10%，N<sub>2</sub>: 85%）で培養した。なお，定性試験用の乳剤も同様の条件でそれぞれ培養した。

増菌培養後，各々 1 白金耳を mCCDA 培地<sup>3)</sup> (Oxoid) [カンピロバクター血液無添加選択培地 (Oxoid) に CCDA サプリメント (Oxoid) を添加したもの] に塗抹し，さらに，42°C，48 時間微好気培養した。培地上の疑わしい集落を常法<sup>5)</sup>により同定し，各段階希釈における試験管のカンピロバクター陽性本数を最確数表に当てはめ，検体 100 g 当たりの菌数を求めた。

#### 2. 二段階増菌法

定性試験用の乳剤（Preston 培地と Bolton 培地の 2 種類）を上述した温度で 24 時間微好気培養後，各々 1 ml を 10 ml の Preston 培地に接種し，さらに 24 時間微好気培養した。培養後，各々 1 白金耳を mCCDA 培地に塗抹し，同様に 48 時間微好気培養後，常法<sup>5)</sup>に基づいてカンピロバクターの同定を行った。

#### 3. 菌種同定法

それぞれの培養法について，1 検体当たり平板に発育した 3 集落について，常法<sup>5)</sup>に基づきカンピロバクターの菌種同定を行った。

### III. 統計学的手法

各培養法による菌分離率および分離株の菌種 (*C. jejuni* と *C. coli*) 割合の比較に際しては， $\chi^2$  検定を用いた有意差検定を行った。

## 結 果

Table 1 に各培養法におけるカンピロバクター分離率と分離株の菌種を比較した結果を示す。定性試験では，Preston 培地を用いた場合に 26.0%，Bolton 培地を用いた場合に 13.0%がカンピロバクター陽性であった。Bolton 培地を用いた場合には，雑菌の発育により菌分

Table 1. Prevalence of *Campylobacter* spp. from 100 samples by each methods, and rate of *C. jejuni* and *C. coli* isolates in the methods.

Method	Number (%) of positive samples	Number of isolates <sup>a)</sup>	Number (%) of the organisms	
			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Preston broth only <sup>b)</sup>	26 (26.0%)*	78	39 (50.0%)	39 (50.0%)
Two-stage enrichment (Preston broth) <sup>c)</sup>	42 (42.0%)**	126	78 (61.9%)	48 (38.1%)
MPN using Preston broth <sup>b)</sup>	24 (24.0%)	72	54 (75.0%)	18 (25.0%)
Bolton broth only <sup>d)</sup>	13 (13.0%***)	39	12 (30.8%)	27 (69.2%)
Two-stage enrichment (Bolton broth) <sup>e)</sup>	33 (33.0%****)	99	58 (58.6%)	41 (41.4%)
MPN using Bolton broth <sup>d)</sup>	37 (37.0%)	111	51 (45.9%)	60 (54.1%)

<sup>a)</sup> Three colonies from each samples were used in this study.

<sup>b)</sup> Sample with Preston broth was incubated at 42°C for 48 hr.

<sup>c)</sup> Sample with Preston broth was incubated at 42°C for 24 hr, then 1 ml of the incubated sample was inoculated into fresh Preston broth (10 ml) and was incubated at 42°C for 24 hr.

<sup>d)</sup> Sample with Bolton broth was incubated at 37°C for 4 hr, then 42°C for 44 hr.

<sup>e)</sup> Sample with Bolton broth was incubated at 37°C for 4 hr, then 42°C for 20 hr. Then, 1 ml of the incubated sample was inoculated to fresh Preston broth (10 ml) and incubated at 42°C for 24 hr.

Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between \*, \*\* and \*\*\*, \*\*\*\*.

離が困難である場合がみられ、その多くは大腸菌であった。

一方、二段階増菌した場合の菌分離率は、Preston 培地を用いた場合に 42.0%、Bolton 培地を用いた場合に 33.0%までそれぞれ増加した ( $p < 0.05$ )。また、MPN 法では Preston 培地を用いた場合に 24.0%、Bolton 培地を用いた場合に 37.0%であった。

分離株の菌種について、定性試験における *C. jejuni* と *C. coli* の割合は、Preston 培地を用いた場合にそれぞれ 50.0%であったが、Bolton 培地を用いた場合にはそれぞれ 30.8%と 69.2%であった。一方、二段階増菌における *C. jejuni* と *C. coli* の割合は、Preston 培地を用いた場合にそれぞれ 61.9%と 38.1%、Bolton 培地を用いた場合にそれぞれ 58.6%と 41.4%であった。Bolton 培地のみを用いた定性試験と Bolton 培地の培養液の一部を Preston 培地に接種した二段階増菌について、分離株の菌種を比較すると、Bolton 培地を用いた場合には、分離株に占める *C. coli* の割合が Preston 培地に比べて高かった ( $p < 0.05$ )。

また、MPN 法における *C. jejuni* と *C. coli* の割合は、Preston 培地を用いた場合にそれぞれ 75.0%と 25.0%、Bolton 培地を用いた場合にそれぞれ 45.9%と 54.1%であった。

Table 2 に Preston 培地を用いた場合と、Bolton 培地を用いた場合の MPN 法による定量検査の結果を示

Table 2. Number of *Campylobacter* spp. in 100 samples incubated with Preston or Bolton broth

Method	Number of <i>Campylobacter</i> spp. (MPN/100 g)			
	<15 <sup>a)</sup>	15-99	100-999	1,200
MPN using Preston broth	76 <sup>b)</sup>	22	2	0
MPN using Bolton broth	63	33	3	1

<sup>a)</sup> Less than the MPN detection limit.

<sup>b)</sup> Sample number.

Table 3. Number of *Campylobacter* and the species of isolates from 4 samples incubated with Preston or Bolton broth

Method	Samples <sup>a)</sup>			
	A	B	C	D
MPN using Preston broth	<15 <sup>b)</sup>	18 [ <i>C. jejuni</i> (3)] <sup>c)</sup>	215 [ <i>C. coli</i> (3)]	75 [ <i>C. coli</i> (3)]
MPN using Bolton broth	465 [ <i>C. coli</i> (3)]	215 [ <i>C. jejuni</i> (2), <i>C. coli</i> (1)]	465 [ <i>C. coli</i> (3)]	1,200 [ <i>C. coli</i> (3)]

<sup>a)</sup> Four samples (A-D) harbored *Campylobacter* spp. over 100 MPN/100 g, and 3 strains were isolated from each samples.

<sup>b)</sup> Less than the MPN detection limit.

<sup>c)</sup> MPN/100 g [Species (Isolation counts)].

す。鶏肉中のカンピロバクター菌数 (MPN/100 g) は、Preston 培地では検出限界 (15 MPN/100 g) 未満が 76.0% (76/100 検体)、15~99 が 22.0% (22/100 検体) で 100~999 が 2.0% (2/100 検体) であったのに対し、Bolton 培地では検出限界 (15MPN/100g) 未満が 63.0% (63/100 検体)、15~99 が 33.0% (33/100 検体)、100~999 が 3.0% (3/100 検体)、1,200 が 1.0% (1/100 検体) であった。

Table 3 に Bolton 培地を用いた場合にカンピロバクター菌数 (MPN/100 g) が 100~999 であった 3 検体 (検体番号 A~C)、および 1,200 であった 1 検体 (検体番号 D) について、Preston 培地を用いた場合のカンピロバクター菌数と分離株の菌種を比較した結果を示す。Preston 培地を用いた場合、検体 A, B, C, D の菌数はそれぞれ <15, 18, 215, 75 MPN/100 g であったが、Bolton 培地を用いた場合の菌数はそれぞれ 465, 215, 465, 1,200 MPN/100 g であり、いずれも Bolton 培地を用いた場合のほうが高い値を示した。また、検体 B では Preston 培地を用いた場合は 3 株とも *C. jejuni* であったが、Bolton 培地を用いた場合は 2 株が *C. jejuni*、1 株は *C. coli* であった。検体 A, C, D ではすべて *C. coli* が分離された。

## 考 察

以前われわれは、冷蔵状態で販売されていた国産鶏肉を 4°C、3 日間保存した場合と -20°C、14 日間保存した場合それぞれについて、増菌培養時間 (24, 48 および 72 時間の 3 条件) と菌分離率との関係を比較したところ、冷蔵品は 24 時間、冷凍品は 48 時間培養による菌分離率をもっとも高いことを報告した<sup>9)</sup>。このことから、今回は増菌培養時間を 48 時間として、各培養法による菌分離率の比較を行った。

定性試験では、菌分離率を上げるために乳剤全量を培養したが、増菌培地に Bolton 培地を用いた場合の菌分離率は 13.0%と Preston 培地を用いた場合 (26.0%) の半分であった。この際、Bolton 培地で 48 時間増菌培養した場合には、分離平板として用いた mCCDA 培地一

面に雑菌が発育してしまい、目的菌の分離が困難な場合が多くみられた。雑菌の多くは大腸菌であったが、Preston 培地と異なりポリミキシン B (5,000 U/l) を添加していない Bolton 培地では、これらの菌を抑えることができなかったことが示唆された。

培養液中における共存細菌の影響については、35°C以上では大腸菌の増殖にともなって *C. jejuni* が急速に死滅（減少）することが報告されており<sup>6)</sup>、Bolton 培地を用いた場合には、大腸菌との競合により *C. jejuni* の発育が抑えられたことが示唆された。この結果 Bolton 培地を用いた定性試験で *C. coli* の割合が *C. jejuni* に比べて高かった ( $p < 0.05$ ) ことが推測されたが、大腸菌と *C. coli* との関係（競合性）などについては今後さらに検討する必要があることが考えられた。

次に、MPN 法により測定した 100 g 当たりの鶏肉中のカンピロバクター菌数は、Preston 培地を用いた場合には 100~999 が 2 検体で、これ以外はすべて 100 未満であったのに対して、Bolton 培地では 100~999 が 3 検体で 1,200 が 1 検体であった。このように使用した培地によって汚染菌数の測定結果が異なり、輸入鶏肉のような冷凍食品を対象とする場合には Bolton 培地の使用が有効であることが示唆された。

今回検討した二段階増菌法では、培養 24 時間後に Preston 培地から新たな Preston に接種した場合で 42.0%、Bolton 培地から Preston 培地に接種した場合で 33.0%といずれも菌分離率が高くなった ( $p < 0.05$ )。検査に要する日数は定性試験の場合と変わらないことから、輸入鶏肉のように冷凍・解凍により食品中で菌数が減少することが想定される場合には、検体の乳剤全体を Bolton 培地で（前）増菌後、定量試験には MPN 法を、他方、定性試験には培養液の一部を Preston 培地に接種する二段階増菌法が有効であることが示唆された。食中毒発生時の検食（保存食）の多くは冷凍保存されており、事件解明のために本法の活用が望まれる。

## 要 約

市販の輸入鶏肉からカンピロバクターの分離を行ったところ、Preston 培地を用いた場合に 26 / 100 検体 (26.0%)、Bolton 培地を用いた場合に 13 / 100 検体 (13.0%) から菌が分離された。雑菌に対して抑制の弱い Bolton 培地は、増菌培地に肉を残したままの培養には適さないことが示唆された。

24 時間増菌培養後に Preston 培養液の 1 ml を新たな Preston 培地 (10 ml) に接種した二段階増菌では、菌分離率は 42.0%まで増加し ( $p < 0.05$ )、他方、1 ml を Bolton 培養液から Preston 培地に接種した場合には菌分離率は 33.0%まで増加した ( $p < 0.05$ )。

輸入鶏肉のように冷凍保存された検体では、凍結・解凍過程において、食品中でカンピロバクター菌数の減少が想定されることから、検体の乳剤全量を Bolton 培地で前増菌 (24 時間) 後、培養液の一部を Preston 培地に接種する、二段階増菌法が有効であることが示唆された。

## 文 献

- 1) Annan-Prah, A. and Janc, M.: Chicken-to-human infection with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Biotyping and serotyping correlation. *J. Food. Prot.*, **51**, 562-564 (1988).
- 2) Bolton, F. J. and Robertson, L.: A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.*, **35**, 462-467 (1982).
- 3) Bolton, F. J., Hutchchinson, D. N. and Coates, D.: Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 169-171 (1984).
- 4) Friedman, C. R., Neimann, J., Wegener, H. C. and Tauxe, R. V.: *Campylobacter*, Nachamkin, I. and Blaser, M. J. (eds.), 2nd Ed., p. 121-134, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (2000).
- 5) 伊藤 武: 食品衛生検査指針 微生物編. カンピロバクター, 厚生労働省監修, p. 225-235, 日本食品衛生協会 (2004).
- 6) 伊藤 武, 徳丸雅一: 食中毒菌の制御—データと文献抄録集—, カンピロバクター, 坂井千三編, p. 41, 中央法規出版 (1988).
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課: 平成 17 年食中毒発生状況. 食品衛生研究, **56**, 88-174 (2006).
- 8) 小久保彌太郎: 食品衛生検査指針 微生物編, 汚染指標菌, 厚生労働省監修, p. 135-137, 日本食品衛生協会 (2004).
- 9) 小野一晃, 瀬川由加里, 大塚佳代子, 斎藤章暢, 正木宏幸: 鶏肉からの *Campylobacter jejuni* の分離におけるストマッカー処理の効果, 日獣会誌, **52**, 326-328 (1999).
- 10) 小野一晃, 辻 りえ, 安藤陽子, 大塚佳代子, 柴田 稔, 斎藤章暢, 増谷寿彦: 国産および輸入鶏肉におけるカンピロバクターの汚染状況, 日獣会誌, **56**, 103-105 (2003).