=技 術=

二段階増菌法とイムノクロマト法キット “シカイムノテスト カンピロバクター II” を 併用した鶏肉類からの *Campylobacter jejuni/coli* の 簡易迅速検出法の有効性の検討

小田 隆 弘^{*1, †}・古田 宗 宜^{*1}・徳 永 章 子^{*2}・樋 脇 弘^{*2}

(^{*1}中村学園大学短期大学部, ^{*2}福岡市保健環境研究所)

(受付: 平成23年10月14日)

(受理: 平成24年 4月 6日)

Efficiency of a Simple and Rapid Method Consisting of Two-Stage Enrichment and Immuno-Chromatographical Determination Kit Using “Cica Immuno-Test *Campylobacter* II” for Detections of *Campylobacter jejuni/coli* from Chicken Meat and Giblets

Takahiro ODA^{*1, †}, Munenori FURUTA^{*1}, Akiko TOKUNAGA^{*2}
and Hiroshi HIWAKI^{*2}

(^{*1}Nakamura Gakuen University Junior College, Befu, Jonan-ku,
Fukuoka-shi, Fukuoka 814-0198; [†] Corresponding author)

(^{*2}Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment, Jigyohama,
Chuo-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 810-0065)

はじめに

Campylobacter jejuni/coli (以下, *C. jejuni/coli* と略) は, ここ数年のわが国の食中毒発生件数²¹⁾においてノロウイルスとともに2大食中毒病因物質となっており, 一向に減少傾向が見られない¹¹⁾. 本菌食中毒の原因食品は不明であることが多いが, 原因食品が判明したものはほとんどが食肉関連食品であり, 特に, 鶏肉類(鶏肉および内臓)がその主要な原因^{20, 21)}となっている. 市販鶏肉類における本菌汚染調査は筆者らも含めて多くの研究機関^{4, 5, 15)}で実施しており, 市販鶏肉類が非常に高い本菌汚染状態にあることが明らかとなっている. しかし, 食鳥肉処理施設や鶏肉類流通業者などの鶏肉類取扱現場の衛生検査室では, 検査法の煩雑性や検査に長時

間を要することなどから, あまり検査が行われておらず, その結果, 本菌に対する衛生管理が不十分なままの鶏肉類が日常的に流通している状況^{12, 13, 15)}となっている. したがって, 本菌検査法の簡易化, 迅速化はわが国の食品衛生上の喫緊の課題であるとの認識から, 本菌に対する簡易・迅速検査法の研究^{1, 3, 6, 8, 10, 14, 18)}が種々行われている. それらのうち, 小野ら¹⁴⁾やKawatsuら¹⁰⁾は二段階増菌法が鶏肉類からの*C. jejuni/coli*迅速検査法として有効であると報告している. そこで, われわれは, 二段階増菌法と市販イムノクロマト法キット“シカイムノテスト カンピロバクター II”を併用する方法が鶏肉類中の*C. jejuni/coli*検査法として有効であるかどうかを, 特に二段階増菌における*C. jejuni/coli*菌数変化の面から検討した結果, この方法が鶏肉類中の*C. jejuni/coli*の簡易迅速検出法として有用であると同時に, 一部の鶏肉類検体では一次増菌(24時間培養)段階でも*C. jejuni/coli*の有無が確認できる方法であることを

[†] 連絡先

^{*1} ☎814-0198 福岡市城南区別府5-7-1

^{*2} ☎810-0065 福岡市中央区地行浜2-1-34

見いだしたので報告する。

材料および方法

(1) 供試材料

実験に供した鶏肉類（鶏肉および砂肝などの内臓）は2010年5月から2011年3月までの間に福岡市内または市近郊のスーパー等から購入した100件（皮付き鶏肉75件、砂肝13件、肝臓12件；いずれも冷蔵品）を用いた。

(2) 増菌培養法

増菌培養法は、供試材料（検体）を約5 mm片に滅菌鋏で細切後、十分に混合して均一化した試料から10 gずつをストマック袋（関東化学(株)製）に採取し、9倍量の一次増菌培地を加えてホモゲナイズ後、ストマック袋のまま、特にシーリングすることもせずに42℃で24時間通常のふらん器で培養（好気培養）し、その培養液0.5 mlをシリコ栓付き試験管内の二次増菌培地10 mlに植え継いで、さらに42℃で24時間、好気培養する方法を基本とした。

二段階増菌法における二次増菌培地の比較実験では、一次増菌培地にウマ溶血液5%添加（以下、血加と略）ボルトン培地またはウマ溶血液無添加（以下、血無と略）ボルトン培地の2種類を用い、二次増菌培地に血加ボルトン培地または血加プレストン培地の2種類を組み合わせ、二次増菌培地としてはどちらが適しているかを検討した。二段階増菌法における一次増菌培地の比較実験では、一次増菌培地を、血加ボルトン培地、血無ボルトン培地、血加プレストン培地、血無プレストン培地の4種類とし、二次増菌培地は、前述の二次増菌培地の検討結果から血加プレストン培地のみを用いた。

なお、比較のため、上記と同様に処理した検体10 gに9倍量の血加ボルトン培地を加えてホモゲナイズしたストマック袋を容器に入れ、微好気状態作成パック（「アネロパック・微好気」；三菱化学(株)製）を用いて48時間、微好気培養する方法をいずれの実験においても、対照法（コントロール法）として用いた。

(3) イムノクロマト法

イムノクロマト法は、“シカイムノテスト カンピロバクター II”（関東化学(株)製）を用いた。使用方法是取扱説明書に従い、増菌培養液0.75 mlを専用容器に分注後、沸騰水中で10分間加熱したのち、添付の反応液を指定量加えて攪拌し、ストリップを差し込んでから20分後に判定した。

(4) コロニー分離法

コロニー分離により *C. jejuni/coli* を確認する方法は常法²²⁾に従い、培養後の液をmCCDA寒天生培地（関東化学(株)製）およびバツラー培地（OXOID製基礎培地にサプリメントおよびウマ溶血液5%添加、以下同じ）の両方の平板培地各2枚ずつに塗抹し、42℃、48時間微好気培養して *C. jejuni/coli* コロニーを検出した。両培地のいずれか、または両方で *C. jejuni/coli* コロ

ニーが検出された場合を陽性とした。 *C. jejuni/coli* コロニーの確認はラテックスキット（OXOID ドライスポット カンピロバクターテスト）を用いた。

(5) *C. jejuni/coli* 菌数測定法

検体中もしくは培養液中の *C. jejuni/coli* 菌数の測定は、検体もしくは培養液を適宜希釈し、その0.1 mlをバツラー培地にコンラージ塗抹し、前記（4）と同様に培養し *C. jejuni/coli* 菌の典型コロニー数を計測して算出した。平板上の典型コロニーは1平板につき最低1コロニーを、やや紛らわしい場合は3コロニー程度に対してラテックスキットによる確認を行い、 *C. jejuni/coli* であることを確認した。

(6) 鶏肉冷凍品からの *C. jejuni/coli* の検出

−20℃で2〜3週間凍結保存していた検体のうち、前記（2）で行った増菌実験により *C. jejuni/coli* が陽性であることが判明した検体（増菌する前の鶏肉類1 g当たりの *C. jejuni/coli* 菌数はすべて 10^2 cfu/g未満）の10検体を用いて、前述の（2）に記載した二段階増菌法における一次増菌培地の比較実験と同様の方法で *C. jejuni/coli* 検出実験を行った。なお、解凍は流水による急速解凍法で行った。

(7) 一般生菌数の測定

一般生菌数の測定は、検体もしくは増菌液を適宜希釈した液に標準寒天培地を混釈し、固化後、42℃で48時間好気培養して測定した。なお、 *C. jejuni/coli* の培養温度における一般生菌数（夾雑菌数）を把握する目的のために42℃培養を用いた。

(8) 統計的処理

各実験における有意差検定は、Fisherの χ^2 検定法にYatesの補正を施した方法で検定し、有意差の判定は $p < 0.05$ で行った。

結 果

1. 二段階増菌法における二次増菌培地の比較

二段階増菌法における一次増菌培地に血加ボルトン培地または血無ボルトン培地の2種類を用いて、二次増菌培地として血加ボルトン培地または血加プレストン培地のどちらが *C. jejuni/coli* 検出率が高いかを鶏肉類40件で検討した結果を対照法の結果と併せてTable 1に示した。

一次増菌培地に血加ボルトン培地を用いた場合でも、血無ボルトン培地を用いた場合でも、 *C. jejuni/coli* 検出率に大きな差は見られず、一次増菌用ボルトン培地にウマ溶血液を添加しなくても *C. jejuni/coli* 検出に遜色がない結果（有意差なし）であった。また、この実験で用いたいずれの方法においてもコロニー分離法とイムノクロマト法で有意差は認められなかった。なお、コロニー分離法では、mCCDA培地では夾雑菌のため *C. jejuni/coli* が検出できない検体があった（その差異についてのデータは省略）が、mCCDA培地で *C. jejuni/coli*

Table 1. *C. jejuni/coli* detection ratios of Bolton broth and Preston broth using as second stage enrichment in two-stage enrichment culture

First stage broth		Second stage broth	Number of tested	Number of <i>C. jejuni/coli</i> positive samples* ¹ (%)	
				Colony isolation method* ²	Immunochromatogr. method* ³
Two-stage enrichment culture* ⁴	Bolton blood (−)* ⁵	Bolton blood (+)	40	30 (75.0)	16 (40.0)
		Preston blood (+)	40	34 (85.0)	27 (67.5)
	Bolton blood (+)* ⁶	Bolton blood (+)	40	29 (72.5)	17 (42.5)
		Preston blood (+)	40	33 (82.5)	27 (67.5)
Control	Bolton blood (+), 48 h at microaerobic* ⁷		40	26 (65.0)	23 (57.5)

*¹ Samples were raw chicken meat and giblets.*² Colony (colonies) of *C. jejuni/coli* on Butzler agar medium was (were) isolated.*³ Using of immunochromatography kit ("Cica immuno-test *Campylobacter* II")*⁴ Two-stage enrichment cultures were performed under aerobic condition.*⁵ Horse blood non-added.*⁶ Horse blood added at 5% concentration.*⁷ One stage enrichment culture using horse blood added (5%) Bolton broth at 42°C for 48 h under microaerobic condition.Table 2. *C. jejuni/coli* detection ratios at second stage enrichment in two-stage enrichment culture using of different first stage broths

First stage broth		Second stage broth	Number of tested	Number of <i>C. jejuni/coli</i> positive samples (%)	
				Colony isolation method	Immunochromatogr. method
Two-stage enrichment culture	Bolton blood (−)	Preston blood (+)	60	37 (61.2)	31 (51.7)**
	Bolton blood (+)		60	43 (71.7)	42 (70.0)
	Preston blood (−)		60	45 (75.5)	44 (73.3)*
	Preston blood (+)		60	42 (70.0)	38 (63.3)
Control	Bolton blood (+), 48 h at microaerobic		60	35 (58.3)	33 (55.0)

Experiment conditions and abbreviations in the table were same as Table 1.

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

が検出された検体はすべてバツラー培地でも *C. jejuni/coli* が検出されたので、コロニー分離法での *C. jejuni/coli* 検出率にはバツラー培地での陽性率を用いた。 *C. jejuni/coli* 検出までの検査時間の面では、イムノクロマト法は増菌液中の *C. jejuni/coli* の検出が30分程度で済むため、増菌時間を加えても2日後に結果が得られたが、コロニー分離法では、増菌後にmCCDA寒天培地などでの微好気培養に48時間以上が必要であったため、結果が得られるのに4日以上を要した。なお、イムノクロマト法で *C. jejuni/coli* が検出された検体はすべてコロニー分離法でも *C. jejuni/coli* が検出され、イムノクロマト法での擬陽性は見られなかった。

2. 二段階増菌法における一次増菌培地の比較

前記の実験で検討した二段階増菌法での二次増菌培地の検討では、*C. jejuni/coli* 検出率に血加ボルトン培地と血加プレストン培地で差がなかった(有意差なし)が、血加プレストン培地のほうがやや高い傾向を示したので、二次増菌培地に血加プレストン培地を採用することとして、次に、新たな検体60件を用いて一次増菌培地

の検討を行った。

血加ボルトン培地、血無ボルトン培地、血加プレストン培地、血無プレストン培地の4種類を一次増菌培地に用いてコロニー分離法とイムノクロマト法により *C. jejuni/coli* 検出率の比較を行った結果をTable 2に示した。

一次増菌培地に血無プレストン培地を用いた場合には、コロニー分離法(75.5%)と、イムノクロマト法(73.3%)で *C. jejuni/coli* 検出率に有意差はなかった($p < 0.05$)。一方、一次増菌培地に血無ボルトン培地を用いた場合には、イムノクロマト法(51.7%)よりも、コロニー分離法(61.2%)のほうが有意差は認められなかったが、やや高い傾向を示した。また、一次増菌培地に血加ボルトン培地または血加プレストン培地を用いた場合のコロニー分離法の検出率(71.7%, 70.0%)とイムノクロマト法の検出率(70.0%, 63.3%)との間では差は認められなかった。なお、この実験においても、イムノクロマト法で *C. jejuni/coli* が検出された検体はすべてコロニー分離法(バツラー培地での検出)でも *C. jeju-*

*ni/coli*が検出され、イムノクロマト法での擬陽性は見られなかった。

3. 二段階増菌法における *C. jejuni/coli* 菌数および一般生菌数

前記の二段階増菌法における一次増菌培地の比較実験で用いた60件の増菌前の検体1g当たりの *C. jejuni/coli* 菌数と、60件のうちの20件について測定した増菌前の検体の一般生菌数の分布をTable 3に示した。増菌前の検体の *C. jejuni/coli* 菌数は、 10^2 cfu/g以下が52件 (86.7%)、 10^2 cfu/g台が5件 (8.3%)、 10^3 cfu/g台が3件 (5.0%) であった。また、一般生菌数では、20件中 10^2

cfu/g台 が2件 (10.0%)、 10^3 cfu/g台 が10件 (50.0%)、 10^4 cfu/g台 が5件 (25.0%)、 10^5 cfu/g台 が3件 (15.0%) であった。

60検体の48時間培養後（二段階増菌法での二次増菌後、および対照法における48時間培養後の両者を指す。以下、同じ）の *C. jejuni/coli* 菌数のオーダー別の度数分布と、そのうちの40検体について調べた24時間培養後（二段階増菌法での一次増菌後、および対照法における24時間培養後の両者を指す。以下同じ）の *C. jejuni/coli* 菌数のオーダー別の度数分布をFig. 1に示した。

24時間培養後では、いずれの増菌法においても

Table 3. Counts level of *C. jejuni/coli* and viable bacteria in tested samples*1

	Number of tested	Counts level (Log cfu/g)				
		<2	2	3	4	5
<i>C. jejuni/coli</i> *2	60	52 (86.7)*3	5 (8.3)	3 (5.0)	0	0
Viable bacteria*4	20	0	2 (10.0)	10 (50.0%)	5 (25.0)	3 (15.0)

*1 Samples were raw chicken meat and giblets.

*2 Colonies on Butzler agar medium were counted.

*3 Parentheses were ratios (%) against for number of tested samples.

*4 Counting was performed by standard plate count method (but, culture temp. was 42°C).

Fig. 1. Distribution of *C. jejuni/coli* counts of enrichment samples at first and second stage enrichment.

Fig. 2 *C. jejuni/coli* counts at 24 h enrichment and 48 h enrichment in some samples.

10^6 cfu/ml以上の *C. jejuni/coli* 菌数にまで増殖していない検体が多く見られたが、48時間培養後では、いずれの増菌法においても 10^6 cfu/ml以上に *C. jejuni/coli* 菌数が増加している検体が多数を占めた。特に、一次増菌に血無プレストン培地を用いた二段階増菌法では60件中43件(71.7%)が48時間培養後に *C. jejuni/coli* 菌数が 10^6 cfu/ml以上に増菌していた。また、対照法では、60件中20件(33.3%)で48時間培養後の *C. jejuni/coli* 菌数が 10^3 cfu/ml未満を示した。

4例について、各増菌法における増菌前、24時間培養後、48時間培養後の *C. jejuni/coli* 菌数変化をFig. 2(a)～(d)に示した。

各二段階増菌法および対照法における *C. jejuni/coli* 菌増殖パターンは検体により異なることが観察された。対照法では、Fig. 2(c)やFig. 2(d)に見られるように、24時間培養後よりも48時間培養後のほうが *C. jejuni/coli* 菌数が低下するケースも散見(40件中5件; 12.5%)され、同一培地での長時間培養により *C. jejuni/coli* 菌が激減するケースがあることも判明した。

しかし、一次増菌に血無プレストン培地を、二次増菌

に血加プレストン培地を用いた二段階増菌法では、47件のうち43件(91.5%)の検体で、48時間培養後には 10^6 cfu/ml以上の *C. jejuni/coli* 菌数を示し、24時間培養後よりも *C. jejuni/coli* 菌数が低下する検体は1例も見られなかった。

20件について24時間培養後と48時間培養後の一般生菌数のオーダー別の度数分布をFig. 3に示した(同一検体における一般生菌数の変化グラフ例は省略)。

大半の検体において一般生菌数は24時間培養後にすでに 10^7 cfu/ml以上まで増加し、その状態が48時間培養後まで継続することが判明した。一次増菌培地に血無プレストン培地を、二次増菌培地に血加プレストン培地を用いた二次増菌法の場合でも24時間培養後に一般生菌数の急激な増加が起こることもわかった(グラフは省略)。

なお、用いた検体の部位(肉、肝、砂肝)による差異や特徴は *C. jejuni/coli* 増殖においても、一般生菌数増殖においても特に見られなかった(データは省略)。

Fig. 3. Distribution of viable bacterial counts of enrichment samples at first and second stage enrichment.

Table 4 *C. jejuni/coli* detection ratios at first stage enrichment in two-stage enrichment culture

First stage broth	Number of tested	Number of <i>C. jejuni/coli</i> positive samples (%)	
		Colony isolation method	Immunochromatogr. method
Bolton blood (-)	40	12 (30.0)	7 (17.5)
Bolton blood (+)	40	22 (55.0)	10 (25.0)
Preston blood (-)	40	26 (65.0)	17 (42.5)
Preston blood (+)	40	26 (65.0)	16 (40.0)

Experiment conditions and abbreviations in the table were same as Table 1.

4. 24時間培養時点での *C. jejuni/coli* 検出率の比較

前実験で24時間培養時点におけるコロニー分離法とイムノクロマト法の *C. jejuni/coli* 検出率を比較した。その結果を Table 4 に示した (二段階増菌法4法についてのみ実施)。

一次増菌に血無プレストン培地を用いた24時間培養液では、イムノクロマト法でも40%程度 (40件中17件) の *C. jejuni/coli* 検出率が得られることが判明した。

5. 冷凍鶏肉に対する二段階増菌法の有効性の検討

冷凍鶏肉を用いた場合のコロニー分離法とイムノクロマト法の *C. jejuni/coli* 検出率を Table 5 に示した。

一次増菌培地に血無プレストン培地を、二次増菌培地に血加プレストン培地を用いた方法では、コロニー分離法とイムノクロマト法において10件中7件から *C. jejuni/coli* が検出された。

考 察

食品や糞便材料からの *C. jejuni/coli* の検出に現在多

Table 5. *C. jejuni/coli* detection ratio of two-stage enrichment culture for frozen-chicken meat samples*¹

First stage broth	Second stage broth	Number of tested	Number of <i>C. jejuni/coli</i> positive samples (%)	
			Colony isolation method	Immunochromatogr. method
Two-stage enrichment culture	Bolton blood (－)	10	7 (70.0)	7 (70.0)
	Bolton blood (+)	10	6 (60.0)	4 (40.0)
	Preston blood (－)	10	7 (70.0)	7 (70.0)
	Preston blood (+)	10	6 (60.0)	4 (40.0)
Control	Bolton blood (+), 48 h at microaerobic	10	6 (60.0)	5 (50.0)

*¹ Frozen (at -20°C for 2-3 weeks) chicken meat samples (*C. jejuni/coli* were positive in Table 2, but *C. jejuni/coli* counts were less than $10^2/\text{g}$ at pre-freezing) were used after defrosting.

Experiment conditions and abbreviations in the table were same as Table 1.

用されている方法^{9,20)}は、血加ボルトン培地または血加プレストン培地で 42°C 、48時間（または24時間）微好気培養後に、mCCDA培地等の寒天培地に分離塗抹して*C. jejuni/coli*のコロニーを分離確認するため、検査日数が最低でも3~4日（性状確認のための培養を併用する場合は、それ以上の日数）を要する。そのため、*C. jejuni/coli*検出の迅速化を目的として、コロニー分離法の代わりにPCR法^{1,3,6,8,18)}やイムノクロマト法^{10,16)}の応用が試みられている。しかし、PCR法やイムノクロマト法では、増菌培養後に*C. jejuni/coli*が一定以上（PCR法では 10^4 cfu/ml以上、イムノクロマト法では 10^6 cfu/ml以上）に増菌していることが必要とされ^{6,8,16)}、これらによる検出法では確実な増菌法が不可欠となる。小野ら¹⁴⁾やKawatsuら¹⁰⁾は鶏肉類中の*C. jejuni/coli*菌の増菌法として二段階増菌法を推奨している。一方、Gisendorfら⁶⁾やHilbertら⁷⁾は、鶏肉類からの*C. jejuni/coli*菌の増菌には微好気培養が不要であると報告している。そこで、われわれは、小野らやKawatsuらの二段階増菌法に、微好気培養を行わない増菌法を併用し、二段階増菌法にイムノクロマト法を用いて*C. jejuni/coli*を検出する簡易法の検討を行った。

一次増菌培地と二次増菌培地の検討では、まず、使用液量が少なく調製が容易である二次増菌培地の検討を先に行い、次いで一次増菌培地の検討を行った。その結果、一次増菌培地に、血加ボルトン培地、血無プレストン培地、血加プレストン培地のいずれを用いても（二次増菌培地はすべて血加プレストン培地で共通）、*C. jejuni/coli*検出率に有意差が認められなかった。なお、一次増菌培地の検討に血無培地も用いた理由は、Kawatsuら¹⁰⁾やWilliamsら¹⁹⁾が報告しているような、一次増菌培地へのウマ溶血液添加の手間と経費の削減が実際に可能かを検討するために実施した。得られた結果から、馬血液添加が不要で調製が容易な血無プレストン培地を一次増菌培地として用いるのが簡便であることがわかった。

今回の二段階増菌法はすべて好気培養により実施した

が、イムノクロマト法を併用する場合は、コロニーを分離培養するための微好気培養も不要なため、簡易に*C. jejuni/coli*検査ができることもわかった。

また、今回の実験において、イムノクロマト法で陽性と判定された検体はすべてコロニー分離法でも*C. jejuni/coli*が検出され、擬陽性は見られなかったことから、今回使用したイムノクロマト法の信頼性は非常に高いことが判明した。また、今回使用したイムノクロマト法の*C. jejuni/coli*検出感度は、データは示していないが、 10^6 cfu/ml以上と考えられた。

なお、*C. jejuni/coli*を含む鶏肉類検体の一部（今回の成績では約40%程度）では一次増菌（24時間）後にイムノクロマト法を実施することによって*C. jejuni/coli*陽性との結果が得られた。しかし、微好気培養を実施していないためか、大半の場合には、二段階増菌法を実施しなければ確実な検査結果が得られないことも明らかであった。したがって、一次増菌後にイムノクロマト法を行い、陰性の場合には二次増菌後に再度イムノクロマト法を行うのが現時点では最も効率かつ迅速に結果が得られる鶏肉類中*C. jejuni/coli*検査法であると考えられる。

*C. jejuni/coli*菌数の変化を一次増菌時点（24時間培養後）と二次増菌時点（48時間培養後）で調べた結果、24時間培養後より48時間培養後のほうが*C. jejuni/coli*菌数が高いケースが大半ではあったが、対照法では24時間培養後より48時間培養後のほうが逆に*C. jejuni/coli*菌数が低くなるケース（40件中5件；12.5%）もあり、その中には48時間培養後に 10^3 cfu/ml以下まで減少するケースもあることが明らかとなった。このことは、対照法による増菌後にコロニー分離法を用いる場合には、24時間培養後と48時間培養後の両方で分離塗抹をしないと*C. jejuni/coli*陽性検体を見落としてしまう危険性があることを示唆している。今回、筆者らは、コロニー分離法ではmCCDA培地とバツラー培地を用いたが、小野ら^{12,13)}が指摘しているのと同様に、mCCDA培地では夾雑菌の旺盛な増殖のため*C. jejuni/coli*コロニーが発見できないことも多かった。したがって、コロニー

分離法を用いる場合には、上記の24時間培養後と48時間培養後の両方での分離塗抹に加えて、分離培地にはmCCDA培地とそれ以外の分離培地（バツラー培地など）の併用を行わないと*C. jejuni/coli*陽性検体を見落としてしまう危険性が懸念される。

一方、食品検査においては、損傷菌検出への考慮が必要とされており、*C. jejuni/coli*検出の場合に開発された培地がボルトン培地²⁾である。今回検討した二段階増菌法を冷凍鶏肉類に応用した結果では、一次増菌培地に血無プレストン培地を、二次増菌培地に血加プレストン培地を用いた増菌液をイムノクロマト法により*C. jejuni/coli*を検出する方法は対照法に遜色がない*C. jejuni/coli*検出成績が得られた。横山²¹⁾や小野ら¹⁵⁾は、冷凍鶏肉からの*C. jejuni/coli*検出では血加ボルトン培地のほうが血加プレストン培地よりも優れていたと報告しているが、今回、一次増菌培地に血無プレストン培地を用いた場合の検出率は血加ボルトン培地を用いた場合（二次増菌はいずれも血加プレストン培地）の検出率と差がなかった。しかし、供試検体数が少ないため、今後、冷凍鶏肉類への実験例数を増やしてさらに調べていきたい。なお、今回の実験では、*C. jejuni*と*C. coli*の区別を一切行っていないが、増菌培地の種類により両菌の検出率に差があるとの報告³⁾もされているので、ここで報告した二段階増菌法が両菌検出に差があるかどうか今後検討していきたい。また、鶏肉類以外の食肉類や糞便材料への有効性や、二段階増菌法での二次増菌用プレストン培地として市販簡易品¹⁷⁾が利用できないかどうかなどの検討も行う予定である。

今回、筆者らが報告した*C. jejuni/coli*簡易迅速検査法が鶏肉類などの食肉取扱現場の衛生検査に利用されて、*C. jejuni/coli*検査と衛生管理が行き届いた鶏肉類が流通すること、ひいては、鶏肉類が原因の*C. jejuni/coli*食中毒が減少することを切に期待したい。

要 約

鶏肉類からの*C. jejuni/coli*検出を簡易迅速に行うために、二段階増菌による増菌培養液にイムノクロマト法を併用する方法を鶏肉類100件を用いて検討した。その結果、一次増菌培地に血無プレストン培地を、二次増菌培地に血加プレストン培地を用い、非微好気培養下で増菌培養後にイムノクロマト法を行う方法が、*C. jejuni/coli*の簡易迅速検出法として有用であった。この方法で得られた*C. jejuni/coli*検出率(73.3%)は、対照法(ウマ血液添加ボルトン培地42℃ 48時間微好気培養)にイムノクロマト法を応用したときの検出率(55.5%)や、コロニー分離法を用いたときの検出率(58.3%)よりもやや高い傾向を示した。本法はウマ溶血液が微量で済み、微好気培養も不要であり、二段階増菌時間(48時間)とイムノクロマト法による*C. jejuni/coli*検出時間(30分強)を加えても、検査に要する日数は2日間であ

ることから、鶏肉類取扱現場での品質管理などにおける*C. jejuni/coli*検査法として有効であると考えられる。

文 献

- 1) 安形則雄: *Campylobacter* 検出のための semi-nested PCR 法の検討. 日食微誌, **17**, 19-21 (2000).
- 2) Bolton, F. J. and Robertson, L.: A selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol., **35**, 462-467 (1982).
- 3) 伊達佳美, 浅井良夫, 古川一郎, 相川勝弘, 石原ともえ, 黒木俊郎: リアルタイムPCR法を用いた*Campylobacter jejuni*と*C. coli*のための選択増菌培地の評価. 日食微誌, **28**, 186-192 (2011).
- 4) 古畑勝則, 柿本将平, 百田隆祥, 小島 禎, 池戸正成, 福山正文: LAMP法および培養法による市販鶏肉からのカンピロバクターの検出比較. 日食微誌, **23**, 237-241 (2006).
- 5) 古田宗宜, 小田隆弘, 樋脇 弘, 財津修一, 村上光一, 馬場 愛, 江渕寿美, 金子孝昌, 木原温子: 市販鶏肉類における *Campylobacter jejuni/coli*, *Salmonella* ならびに糞便系大腸菌群の汚染状況の関係. 日食微誌, **27**, 200-205 (2010).
- 6) Gisendorf, B. A. J., Quint, W. G. V., Henkens, M. H. C., Stegeman, H., Huf, F. A. and Niesters, H. G.: Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 3804-3808 (1992).
- 7) Hilbert, F., Scherwitzel, M., Paulsen, P. and Szostak, M. P.: Survival of *Campylobacter jejuni/coli* under condition of atmospheric oxygen tension with the support of *Pseudomonas* spp. Appl. Environ. Microbiol., **76**, 5911-5917 (2010).
- 8) 樋脇 弘, 馬場 愛, 江渕寿美, 古田宗宜, 小田隆弘, 宮本敬久: Light upon eXtension fluorogenic primer を使ったリアルタイムPCR法による食品増菌液からの *Campylobacter jejuni/coli* の検出. 日食微誌, **26**, 120-126 (2009).
- 9) 伊藤 武: *Campylobacter jejuni/coli*. 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編, p. 345-349, 中央法規出版, 東京 (2000).
- 10) Kawatsu, K., Taguchi, M., Yonekita, T., Matsumoto, T., Morimatsu, F. and Kumeda, Y.: Simple and rapid detection of *Campylobacter* spp. in naturally contaminated chicken meat samples by combination of a two-step enrichment method with an immunochromatographic assay. Int. J. Food Microbiol., **142**, 256-259 (2010).
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課: 平成21年食中毒発生状況. 食品衛生研究, **60**, 90-176 (2010).
- 12) 小野一見, 安藤陽子, 尾関由姫恵, 柳川敬子, 中川俊夫: 小規模食鳥処理場における鶏肉のカンピロバクター汚染とその対策. 日食微誌, **24**, 44-48 (2007).
- 13) 小野一見, 安藤陽子, 尾関由姫恵, 杉田英章, 柳川敬子, 中川俊夫: 食鳥処理施設における鶏肉のカンピロバクター汚染とその対策. 日食微誌, **24**, 194-197 (2007).
- 14) 小野一見, 安藤陽子, 柳川敬子, 中川俊夫: 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. 日食微誌, **24**, 130-133 (2007).

- 15) 小野一見: 牛レバーや鶏レバーのカンピロバクター汚染状況. 食品衛生研究, **56**, 17-24 (2006).
- 16) 鈴木富美: 微生物の簡易迅速検出法ならびに同定法の現状と進歩(9) 食品検査におけるイムノクロマト法による簡易・迅速微生物検出. 防菌防黴, **34**, 105-114 (2006).
- 17) 梅迫誠一, 百武晃宏, 加藤孝広, 青柴孝宏, 金子常雄: カンピロバクター増菌培地の検討: 簡易に調整可能な培地「プチットカンピロ (プレストン)」の非微好気培養の検討. 日食微誌, **27**, 171-176 (2010).
- 18) Wegmuller, B., Luthy, J. and Candrian, U.: Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. Appl. Environ. Microbiol., **59**, 2161-2165 (1993).
- 19) Williams, L. K., Jorgensen, F., Grogono-Thoma, R. and Humphrey, T. M.: Enrichment culture for isolation of *Campylobacter* spp: Effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. Int. J. Food Microbiol., **130**, 131-134 (2009).
- 20) 横山敬子: 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法9 カンピロバクター. 防菌防黴, **37**, 149-156 (2009).
- 21) 横山敬子: カンピロバクター食中毒の発生状況. 日食微誌, **23**, 109-113 (2006).
- 22) 横山敬子, 高橋正樹: *Campylobacter jejuni/coli*. 食品由来感染症と食品微生物, 仲西寿男, 丸山 務監修, p. 347-364, 中央法規出版, 東京 (2009).