



カンピロバクターの検査法について

(財)東京顕微鏡院 伊藤 武

「es」とは、栄研化学株式会社がお届けする、環境：Environment 衛生：Sanitationを主体とした微生物検査：Examinationの葉(しおり)です。



LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法



LAMP法は1ステップ、等温でできる遺伝子増幅法です。
標的遺伝子の6箇所の領域を4種類のプライマーで認識し、
1時間以内で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍(社内データ)に増幅することができます。

食品・環境検査用	サルモネラ検出試薬キット
	腸管出血性大腸菌検出試薬キット
	ペロ毒素(VT)タイピング試薬キット
	大腸菌O157検出試薬キット
	<i>L.monocytogenes</i> 検出試薬キット
研究用	カンピロバクター検出試薬キット
	ノロウイルスGI検出試薬キット
	ノロウイルスGII検出試薬キット

販売元

FUJITSU 富士通システムソリューションズ

製造販売元

栄研化学株式会社

〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地

【問い合わせ先】
お客様相談窓口
フリーダイヤル ☎ 0120-308-421

はじめに

*Campylobacter jejuni*は1972年 Butzlerらにより下痢症の原因菌として明らかにされた重要な病原菌である。本菌は主に食品や飲料水を媒介として感染することから国内では1983年から食中毒菌であると認識され、その検査法も確立されてきた。また、本菌の分類学的研究も進展し、新たな分類体系も示されてきた。これらの最新知見を踏まえて*C.jejuni*/*C.coli*の分離法を中心に解説する。

1. カンピロバクターの分類

Butzlerらが人糞便から*C.jejuni*を検出して以降、ヒトや各種動物の腸内容物から様々な*Campylobacter*属の新菌種が発見され、本菌属と類似菌の分類体系が整理された¹⁾。図1に示すごとく微好気(一部嫌気性)ないし好氣的に発育するグラム陰性の螺旋状ないし湾曲した細菌で、16S rRNAの塩基配列に基づく系統発生的解析からカンピロバクター目を新設し、ヒトに病原性を示すものとしてカンピロバクター科とヘリコバクター科に分け、カンピロバクター科に*Campylobacter*属と*Arcobacter*属が分類された。*Campylobacter*属には現在19菌種、5亜種、3生物型が含まれている。これらのうちヒトの下痢症(食中毒)などに関わる主な*Campylobacter*属菌と*Arcobacter*属菌を表1に示した。国内の食中毒や散発下痢患者から検出される約90%が*C.jejuni*で、8%が*C.coli*であり、*C.lari*、*C.upsaliensis*、*C.fetus*亜種*fetus*はまれである²⁾。なお、分類学的には*C.jejuni*は亜種*jejuni*と亜種*doylei*に分類されている。亜種*doylei*は硝酸塩を還元しないし、カタラーゼ陰性または弱産生であることから亜種*jejuni*と区別され、乳児の血液や下痢便から検出された例が報告されているが、病原性が明確にされていないため、一般に*C.jejuni*とした

記載は亜種*jejuni*を意味している。

2. *C.jejuni*、*C.coli*および類似菌の生化学的性状

C.jejuni、*C.coli*は酸素を3-15%要求する微好気性グラム陰性のS字状をした螺旋状細菌で、特有な螺旋状運動(コルクスクリュウ様運動)をする。本菌の大きさは0.2-0.8×0.5-5μmであり、菌体の幅が細く、糸くず様である。培養初期では螺旋

状細菌であるが、培養が古くなると容易に球状化(Coccoide body)となる。*C.jejuni*と*C.coli*の鑑別は馬尿酸加水分解試験が重視され、陽性が*C.jejuni*、陰性が*C.coli*ではあるが、*C.jejuni*の一部の菌株では馬尿酸加水分解試験が陰性である(表2)。また、以前ではNalidixic acid (NA)に対する感受性試験が重視されてきたが、近年ではNA耐性の*C.jejuni*や*C.coli*があり、類似菌との絶対的な鑑別試験ではない。これらの問題を

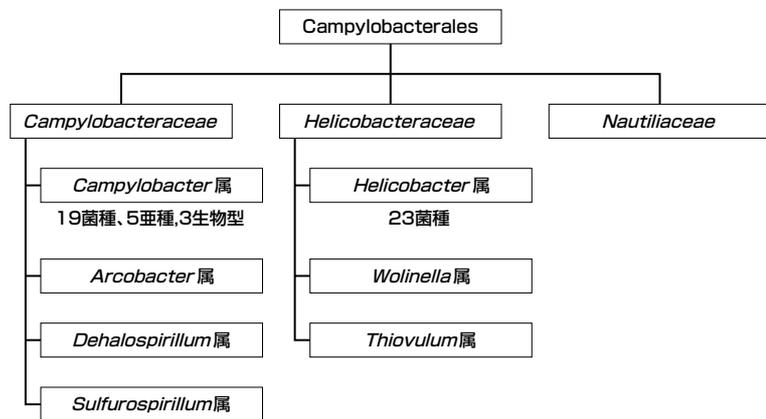


図1 カンピロバクター目の分類

表1 ヒトに病原性を示す主なカンピロバクター科菌

種名	食中毒	下痢症	虫垂炎	敗血症	胆嚢炎
<i>C.jejuni</i>	腹膜炎	流産	尿路感染症	ギラン・バレー症候群	
<i>C.coli</i>	食中毒	下痢症			
<i>C.lari</i>	食中毒	下痢症	まれ		
<i>C.upsaliensis</i>		下痢症	まれ		
<i>C.fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	敗血症	髄膜炎	心内膜炎	関節炎	下痢症
<i>A.butzleri</i>		下痢症	まれ		

C : *Campylobacter*, A : *Arcobacter*

表2 主なカンピロバクター属菌の性状

菌種	好気培養	オキシダーゼ	カタラーゼ	発育		馬尿酸加水分解	酢酸インドキシリ	感受性	
				25℃	42℃			NA 30μg	CER 30μg
<i>C.jejuni</i>	-	+	+	-	+	+	+	S/R	R
<i>C.coli</i>	-	+	+	-	+	-	+	S/R	R
<i>C.lari</i>	-	+	+	-	+	-	-	R	R
<i>C.upsaliensis</i>	-	+	W	-	+	-	+	S	S
<i>C.fetus</i> 亜種 <i>fetus</i>	-	+	+	+	-	-	-	R	S

補完するためには遺伝子レベルでの同定が必要である。

3. 食品からの*C.jejuni/coli* 試験法

食品微生物試験法に関しては現在、食品からの微生物試験標準法検討委員会(委員長 山本茂貴)で討議が進められており、カンピロバクターの試験法についても検討中で、その結果に基づいて国内のカンピロバクター試験法が整理されるので、ここでは現在広く用いられている食品衛生検査指針に基づいて、私見を交えて述べる。

1) 検査材料の採取と輸送

カンピロバクターは微好気性であり、大気に暴露すると死滅が早く、乾燥条件に抵抗性が無い。ただし、好气的条件でも10℃以下の低温では長時間生存するが、25℃以上では早急に死滅することから、食品は滅菌ビニール袋に採取し、しっかり

と口を結び、10℃以下の低温で輸送する。環境の拭き取り材料も食塩加里ン酸緩衝液に入れ、10℃以下の低温で輸送する。

2) 試験法の概要

① 増菌培養

増菌培地としてはこれまでにPrestonブイヨン、Boltonブイヨン、CEM培地、Exeterブイヨン、Hunt & Radle増菌ブイヨン、Doyle & Romanブイヨン、Park & Sandersブイヨンなど様々な増菌培地が報告されてきたが、PrestonブイヨンおよびBoltonブイヨンが広く活用されている。

カンピロバクターの汚染菌量が高い鶏肉では直接分離培養から*C.jejuni*の検出も可能であるが、少量菌汚染の場合には検出できない。図2に示すごとく食品からの*C.jejuni/coli*検出には増菌培養を行う。食品のサンプル量は安全性の基準となっている25gを原則とする。増菌培地であるBoltonブイヨンあるいはPrestonブイヨン225mLを加えて、全量250mLを

微好気条件下で40-48時間培養する。いずれの増菌培地にもgrowth supplement(ピルビン酸ナトリウムなど)が添加されており、酸素抵抗性が增強され、好气的条件下でも発育が良好とされているが、増菌培養液を好气的に培養した場合と微好気培養とを比較した場合、微好气的条件下の方がカンピロバクターの検出率が高まることから、一般的には、微好気培養が推奨されている。

しかし、多数の食品サンプルを増菌培養する場合、250mLを微好气的条件下で培養するためには特殊な微好気孵卵器が必要とされるが、すべての食品微生物検査室で本培養器が整備されていない。一般的には嫌気ジャーが使用されていることから増菌培養液100mLに試料を25g加えて培養する方法や本培養液の10mLを採取して試験管で培養する方法あるいは試料25gに2-3倍量の希釈液で乳剤とし、その1mLを増菌培養液10mLに加えて培養するなど簡便法が用いられている。増菌培養時間も2日培養ではその後の分離培養などを考慮すると結果判定までに4-5日間を要することから増菌培養時間を1日とする簡便法もある。これらの増菌培養法や培養時間に関しては標準法検討委員会の検討結果に従うことになろう。なお、澤村ら⁹⁾は鶏肉25gをPrestonブイヨン100mLで乳剤にし、その30-40mLを増菌培養することにより高率にカンピロバクターが検出されており、考慮すべき報告である。

② 損傷菌の増菌培養

凍結食品や加工食品あるいは酸素に長期間暴露された食品などではカンピロバクターが損傷を受けており、増菌培地に添加されている各種の抗生物質や42℃の高温培養では損傷菌の発育が良好でないことが指摘されている。抗生剤無添加の増菌培地を37℃で数時間培養後抗生剤を添加して42℃で培養する方法などが示されている。

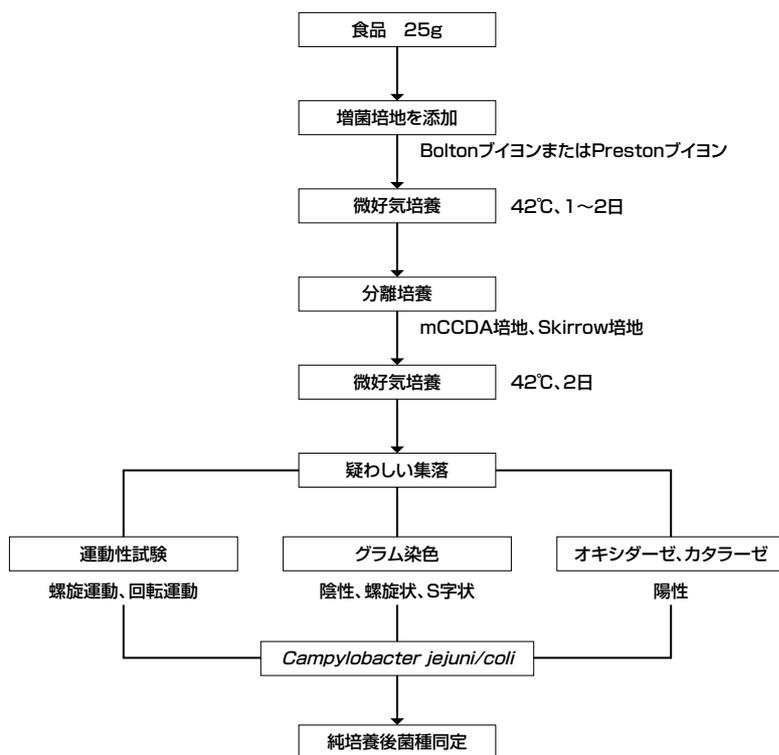


図2 食品からの*C.jejuni/coli* 検出の概要

③分離培養

選択分離培地に関してもこれまでに溶血液を添加したSkirrow培地、Butzler培地、Blaser-Wang培地、Preston培地、血液の代わりに炭抹(チャコール)が添加されたmCCDA培地、Karmali培地、CAT培地などが報告されている。いずれもカンピロバクター以外のグラム陰性菌、陽性菌およびカビを抑制するために各種の抗生剤が添加されている。これらの培地のうちカンピロバクター以外の細菌の抑制力や各種カンピロバクターの発育性から初期の頃はSkirrow培地が利用されていたが、その後Boltonにより開発されてきたmCCDA培地の有用性が評価され、本培地が広く用いられてきた。

増菌培養液をmCCDA培地に塗抹して、嫌気ジャーに平板を入れ、微好気培養用のガス発生袋により、微好気条件として42℃、2日間培養する(図2)。この際、カンピロバクターは乾燥により集落形成が著しく阻害されることから、嫌気ジャー内の湿度を高めるために水で湿らせた濾紙などをジャーに入れること。またカンピロバクターは寒天平板の乾燥を強くすると集落形成が悪くなるので、寒天表面の乾燥は通常の半分ぐらいの時間と

する。

④分離寒天平板上のカンピロバクターの集落

mCCDA培地には各種の抗生剤が添加されていることから、カンピロバクター以外の細菌の発育は極度に抑制される。mCCDA培地上の*C.jejuni*や*C.coli*は42℃、1日間培養では極めて微少な集落であるが、2日間培養ではS型の2-3mmのやや濃い灰色の隆起した特徴ある集落を形成する。ただし、寒天平板上の水分が多いと扁平な集落となる。さらに水分量が多くなると培地面全体にスオーミングを起こし、独立した集落を作らないので注意が必要である。カンピロバクター以外の集落は多くが白色を呈するため、カンピロバクターの集落との区別は容易である。

なお、栄研化学ではmCCDA培地を改良した培地が開発され、本培地もこれまでに市販されているmCCDA培地とは遜色ないことが確認されている³⁾。

⑤*C.jejuni/coli*の同定

mCCDA培地上の集落の観察、集落から位相差顕微鏡による運動性の確認、グラム染色性と形態の観察およびオキシダーゼ試験、カタラーゼ試験により*C.jejuni*および*C.coli*と推察される(図2)。菌種同

定が必要な場合には血液寒天培地で純培養した菌体を用いて、表2に示した、25℃の発育試験、馬尿酸加水分解試験、酢酸インドキシル試験、あるいは好気培養試験を実施する。

おわりに

食品からのカンピロバクターの検出は優れた増菌培地と分離培地があり、菌検出は容易である。分離菌の菌種同定は他の病原菌とは異なる手法を用いるために、やや煩雑である。しかし、42℃の高温で発育するカンピロバクターのほとんどは*C.jejuni/coli*であると考えられ、食品の安全性評価には菌種同定までは特殊な場合以外必要ないと考えられる。

参考文献

- 1) Garrity G.M. *et al.*: Order 1. Campylobacteriales, p.1145 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Sec. Ed Vol.2, Eds Staley, J.T *et al.*, Springer, 2005
- 2) 伊藤 武: 人のカンピロバクター症、*獣医畜産新報*, 60:911-915, 2007
- 3) 澤村健一他: カンピロバクターの増菌培養法と分離培地の検出・評価、第29回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, p37, 2008(広島市)



学会・講習会・展示会 2009年1月~3月

名称	会期	会場	問い合わせ先	備考
(社)日本食品衛生学会 第11回特別シンポジウム「食の安全を巡る新しい動き」	2/6	東京都: 東京大学 農学部弥生講堂	(社)日本食品衛生学会 Tel:03-3470-2933	http://www.shokuhineisei.jp/
シンポジウム「食品の安全を考える」	2/10	東京都: こまば エミナースホール	(社)日本食品衛生協会 事業部 Tel:03-3403-2112	http://www.n-shokuei2.jp/symposium/2902safety.shtml
	2/17	岩手県: (財)岩手教育会館 大ホール		
第37回HOTERES JAPAN 第30回フード・ケータリングショー 第9回厨房設備機器展	2/24~27	東京都: 東京ビックサイト	http://www.jma.or.jp/hcj/jp/	
第24回GMPとバリエーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム「第15改正日本薬局方第2追補を踏まえたGMPとバリエーションの現状を考える」	3/5	東京都: きゅりあん	日本防菌防黴学会事務局	http://www.soc.nii.ac.jp/saaaj/schedule/2008_06.pdf
FOODX JAPAN2009	3/3~6	千葉県: 幕張メッセ	http://www2.jma.or.jp/foodex/ja/index.html	

会期・会場等は変更されることがあります。参加される際は必ずご確認ください。