



# カンピロバクターの検査 —mCCDA培地について—

栄研化学株式会社 営業統括部 渋谷 亮

「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
	ベロ毒素 (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

カンピロバクター(*Campylobacter*)は、幅0.2~0.8×長さ0.5~5 $\mu$ mのグラム陰性の無芽胞桿菌でらせん状の細菌です。酸素濃度3~15%の微好気下で発育し、両端もしくは一端に鞭毛を持ち、コルクスクリュー様の回転運動をします。例外として*C. showae*は複数の鞭毛を有し、*C. gracilis*および*C. hominis*は運動性がありません<sup>1)</sup>。

人のカンピロバクター感染症は主に胃腸炎症状をきたし、その原因の約90%が*C. jejuni*によるもので、*C. coli*は数%です。敗血症や髄膜炎、膿瘍などの検査材料からは*C. fetus*が分離されることがあります。カンピロバクター感染症の一般的な予後は、一部の免疫不全患者を除いて死亡例も少なく良好な経過をとりますが、近年、本菌感染後1~3週間を経て、筋肉を動かす運動神経障害のため急に手や足に力が入らなくなる、ギラン・バレー症候群を発症する事例が報告されています。

カンピロバクター食中毒の発生件数は、細菌性食中毒の中で最も多く、2006年が416件(53.7%)、2007年が416件(56.8%)、2008年が509件(65.4%)と推移しており、ノロウイルスよりも発生件数が多くなっています。

カンピロバクターの検査法については、esNo.047<sup>2)</sup>で紹介しました。カンピロバクターの分離培養には、Skirrow培地、Butzler培地、Blaser-Wang培地、Preston培地などの血液成分が添加された培地が用いられてきましたが、血液の質によって培地性能が左右されることや、雑菌汚染の危険性があること、また利便性や経済面から血液成分を添加しない培地が望まれてきました。

この度、カンピロバクター検査の分離培地として用いられる血液成分無添

加のmodified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar(mCCDA)培地を製品化しましたので紹介します。

## 1. mCCDA培地について

### 1. 製品化の経緯

従来、カンピロバクターの分離培地として、国内ではスキロー培地が微生物検査必携<sup>3)</sup>、食品衛生検査指針<sup>4)</sup>に記載され使用されてきました。一方、米国FDA-CFSAN法<sup>5)</sup>およびISO法など海外の検査法では、mCCDA培地が用いられています。現在、食品からの微生物検査標準法検討委員会(委員長 国立医薬品食品衛生研究所 山本茂貴)にて、「食品からのカンピロバクター(ジェジュニ/コリ)の試験法」の標準化試験法作成が進められている中で、mCCDA培地が指定されています<sup>6)</sup>。これらのことから、国内外で広く知られているmCCDA培地を製品化しました。

### 2. 培地の特徴

mCCDA培地は、Boltonら(1984)<sup>7)</sup>が開発し、その後Hutchinsonら(1984)<sup>8)</sup>により改良された*C. jejuni*分離用の血液無添加培地を基に、カンピロバクター以外の夾雑菌の発育を抑制するように処方した培地です。Boltonらは、血液の代わりに活性炭、硫酸第一鉄、ピルビン酸ナトリウムを添加し、選択剤としてセファゾリンとデスオキシコール酸ナトリウムを処方したCCDA培地を開発し、当時は最も優れたカンピロバクター選択分離培地であったPreston培地と、保存株と糞便検体を用いて性能を比較した成績を報告しました。その結果、カンピロバクターの発育支持力は優れていたものの、糞便検体を用いた検討では、選択性がやや劣っていたため、その後、セファゾリンをセフォペラ

ゾンに代えたmCCDA培地を開発し、高い性能を有していることを報告しました。

### 3. カンピロバクターの集落(図1)

mCCDA培地上でカンピロバクターは、表面が滑らかな灰白色正円のやや隆起した集落をつくります。なお培地表面に水分が多く湿潤の場合には拡散集落になり、独立した集落をつくらぬ場合もあります。*C. jejuni*および*C. coli*の分離には42°C、*C. fetus*は37°Cで48~72時間微好気培養をします。

## 2. mCCDA培地の評価

### 1. カンピロバクターの発育

カンピロバクター55株(*C. jejuni* 50株、*C. coli* 2株、*C. fetus* 3株)を用い、ミスラ法による発育性能を検討しました。供試菌を10<sup>8</sup>~10<sup>2</sup>CFU/mLになるように希釈し、その菌液をmCCDA培地およびスキロー改良培地に滴下し、42°C、48時間微好気培養しました。結果は表1に示す通り、mCCDA培地では、*C. jejuni*は50株中29株が10<sup>2</sup>CFU/mLまで、*C. coli*は2株すべてが10<sup>2</sup>CFU/mLまで、*C. fetus*は3株中1株が10<sup>3</sup>CFU/mLまで発育しました。スキロー改良培地では、*C. jejuni*は50株中34株が10<sup>2</sup>CFU/mLまで、*C. coli*は2株すべてが10<sup>2</sup>CFU/mLまで、*C. fetus*は3株中1株が10<sup>3</sup>CFU/mLまで発育しました。

### 2. 市販鶏肉からのカンピロバクターの分離

市販の鶏肉を用いて、食品衛生検査指針 微生物編(2004)<sup>4)</sup>に従った2つの方法で、カンピロバクターの分離率について検討を行いました。A法は、検体25gをリン酸緩衝希釈水225mLでホモジナイズし、その1mLをPreston培地10mLに加え42°C、24時間の微



図1 mCCDA培地

自社保有菌株を混合後、画線塗抹し42℃、48時間微好気培養

組成 (培地 1,000mLあたり)

ペプトン	10g
カゼイン加水分解物	10g
エキス類	5g
ビルビン酸ナトリウム	0.5g
デスオキシコール酸ナトリウム	0.7g
活性炭	4g
塩類	2g
選択剤	67mg
カンテン	17.5g

pH 7.6±

表1 カンピロバクターの発育

菌種	菌株数	培地	接種菌濃度 (CFU/mL)					
			10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
<i>C. jejuni</i>	50	mCCDA	50/50	50/50	50/50	50/50	48/50	29/50
		スキロー改良	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	34/50
<i>C. coli</i>	2	mCCDA	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
		スキロー改良	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
<i>C. fetus</i>	3	mCCDA	3/3	3/3	3/3	2/3	1/3	—
		スキロー改良	3/3	3/3	3/3	2/3	1/3	—

表2 培養法によるカンピロバクターの分離結果

方法	培地	mCCDA培地		スキロー改良培地	
		栄研	A社品	栄研	B社品
		A法 n=50	1/50 (2%)*	2/50 (4%)	1/50 (2%)
B法 n=105	43/105 (41%)	42/105 (40%)	43/105 (41%)	43/105 (41%)	

\*分離率

好気培養を行い、培養後、培養液の1白金耳量を4種の分離培地に接種し、42℃、48時間の微好気培養を行い、灰白色の集落を形成したものをカンピロバクター陽性とししました。B法は、検体

25gをPreston培地100mLでホモジナイズし、その30~40mLをスピッツ管に採取後、42℃、24時間の微好気培養を行い、培養後はA法と同様に処理しました。その結果、表2に示す通り、A

法ではmCCDA培地、スキロー改良培地、B社品で1検体(2%)、A社品で2検体(4%)からカンピロバクターが分離されました。B法では、mCCDA培地、スキロー改良培地、B社品で43検体(40%)、

A社品で42検体(40%)からカンピロバクターが分離されました。

### 3. ミスラ法による夾雑菌の抑制

ミスラ法による発育抑制力を10種類の保存菌株を用いて行いました。結果は表3に示す通りで、*Pseudomonas aeruginosa*においては、20株中5株が $10^4 \sim 10^7$ CFU/mLの高濃度の菌を接種したときに発育が認められましたが、残りの15株は発育が抑制されました。また、その他の9菌種については、 $10^7$ CFU/mLの高濃度の菌を接種しても発育しませんでした。

## おわりに

mCCDA培地は、処方した選択剤により夾雑菌の発育を強く抑制することが可能であり、市販鶏肉を用いたカンピロバクターの分離の比較検討でも、対象とした3培地と同等の性能を有していることから、カンピロバクターの分離に有効です。

#### 参考文献

- 1) 三澤尚明：モダンメディア, 51(3), 1-8, 2005.
- 2) 伊藤 武：イーズ(環境衛生と微生物検査の葉), No.047, 2009.

査の葉), No.047, 2009.

- 3) 厚生省監修：微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版, 1987.
- 4) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 微生物編, 2004.
- 5) FDA/CFSAN-BAM-Campylobacter : Bacteriological Analytical Manual Online, U. S. Food and Drug Administration, March, 2001.
- 6) 食品からの微生物標準試験法検討委員会, <http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>
- 7) Bolton F. J., et al.: J. Clin. Microbiol., 19 : 169-171, 1984.
- 8) Hutchinson D. N., et al.: J. Clin. Pathol., 34 : 956-957, 1984.

表3 ミスラ法による夾雑菌の抑制

菌種	菌株数	菌接種濃度 (CFU/mL)				
		$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	2/20	1/20	1/20	1/20	—
<i>Candida albicans</i>	10	—	—	—	—	—
<i>Candida glabrata</i>	10	—	—	—	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>	1	—	—	—	—	—
<i>Proteus mirabilis</i>	1	—	—	—	—	—
<i>Proteus vulgaris</i>	1	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	1	—	—	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	—	—	—	—	—
<i>Serratia marcescens</i>	1	—	—	—	—	—
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	—	—	—	—	—



学会・講習会・展示会 2010年1月～3月

名称	会期	会場	問い合わせ先	備考
シンポジウム「安全な食品で健やかな暮らし」	2/12	東京都：九段会館大ホール	(社)日本食品衛生協会 事業部	<a href="http://www.n-shokuei.jp/">http://www.n-shokuei.jp/</a>
	3/15	福島県：グランシア須賀川		
シンポジウム「化学物質と環境・健康」	2/18	宮城県：せんだいメディアテーク	(社)日本食品衛生協会 事業部	<a href="http://www.n-shokuei.jp/">http://www.n-shokuei.jp/</a>
	3/2	東京都：食品衛生センター		
第31回 フード・ケータリングショー 第10回 厨房設備機器展	2/23～26	東京都：東京ビッグサイト		
第25回GMPとバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム「第16改正日本薬局方を踏まえてのGMPとバリデ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	<a href="http://www.soc.nii.ac.jp/saaaj/schedule/2009_09.pdf">http://www.soc.nii.ac.jp/saaaj/schedule/2009_09.pdf</a>
FOODX JAPAN2010	3/2～5	千葉県：幕張メッセ	<a href="http://www3.jma.or.jp/foodex/ja/index.html">http://www3.jma.or.jp/foodex/ja/index.html</a>	

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。

無断複製・無断転載を禁じます

[es] NO.049 (2010年2月発行)

●監修/森地敏樹 ●発行/栄研化学株式会社 栄研化学(株)ホームページ <http://www.eiken.co.jp/>

●編集/栄研化学株式会社 es 事務局 〒110-8408 東京都台東区台東 4-19-9 山口ビル 7 Tel03-5846-3286 Fax03-5846-3292

5078 AK4MK