

= 技 術 =

カンピロバクター増菌培地の検討：簡易に調製可能な培地「プチットカンピロ(プレストン)」の非微好気培養の検討

梅 迫 誠 一[†]・百 武 晃 宏・加 藤 孝 広

青 柴 孝 宏・金 子 常 雄

(株式会社日研生物医学研究所)

(受付：平成 21 年 9 月 7 日)

(受理：平成 22 年 7 月 12 日)

Evaluations by Means of Non-microaerobic and Microaerobic Culture about 「Puchitto-Campylo (Preston)」 that Possibly Be Prepair Easily Enrichment Culture Medium for *Campylobacter jejuni/coli*

Seiichi UMESAKO[†], Akihiro HYAKUTAKE, Takahiro KATO,
Takahiro AOSHIBA and Tsuneo KANEKO

(Nikken Bio Medical Laboratory Inc., Ohhasibe Tsutsumigaien,
Kumiyama, Kuze-gun, Kyoto 613-0046;

[†] Corresponding author)

Campylobacter jejuni are the most major causative agent of bacterial foodborn illness in Japan recently. However, conditioning of enrichment culture medium for *Campylobacter jejuni* are troublesome and are uneconomical because the quantity of prescription is restricted to a large volume and period of preservation is so short. The results are as summarized follows: Puchitto-Campylo stored fresh in refrigeration by long-term retention, were functionally comparative to the ordinary Preston medium. The required number can be adjusted, is very useful for the routin *Campylobacter* inspection for various samples. Our results suggest that, non-micro aerobic culture using Puchitto-Campylo can enrich *Campylobacter jejuni* comparative to micro aerobic condition.

Key words: Enrichment medium for *Campylobacter jejuni/coli*, Non-microaerobic culture, Puchitto-Campylo

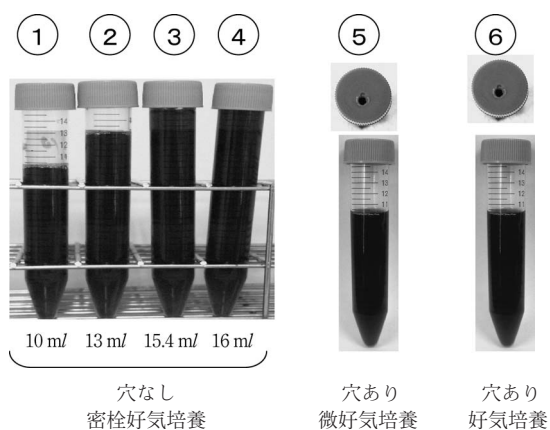
緒 言

1982年に*Campylobacter jejuni/coli* (以下, *C. jejuni/coli*) が食中毒の起原因菌とされてから四半世紀以上が経過した⁹⁾。カンピロバクター食中毒事例は細菌性食中毒の総発生件数が減少傾向であるにもかかわらず、2003年から2008年まで(2006年を除く)第1位(厚生労働省HP: 食中毒統計資料)と食品衛生上重要である¹³⁾。

食中毒発生時のカンピロバクターの検査では、急性期の患者以外の糞便、各種食品、飲料水、調理器具・器材や施設のふき取り検査は汚染菌量が少ないことが予想されるため、選択増菌培地での増菌が必須である^{8, 10, 11)}。食肉処理・加工施設でも衛生管理のため同様に食肉、器具・器材や施設のふき取り検査で増菌培養が実施されている。現在、汎用されている増菌培地はプレストン培地であるが、その培地を自家調製する際、市販の培地用サプリメント1本が培地500ml用のため最少作製量が500mlと限定されている。また、プレストン培地の保存

[†] 連絡先

☎613-0046 京都府久世郡久御山町大橋辺堤外縁23番地



①培地量 10 ml (密栓, 非好気), ②培地量 13 ml (密栓, 非好気), ③培地量 15.4 ml (密栓, 非好気), ④培地量 16 ml (密栓, 非好気), ⑤培地量 10 ml 好気培養 (穴あり), ⑥培地量 10 ml 好気培養 (穴あり)

図1. 通常処方プレストン培地における培養形態

期間が作製後 4℃, 7 日間と比較的短い, このことから使用培地量が少ない検査時などは培地にロスがでる場合が多々ある現状である。

そこで, 10 ml のプレストン培地を使用時に必要数, 簡易に調製でき, またその調製前は冷凍保存できる包装形態「プチットカンピロ」を開発した。「プチットカンピロ」のカンピロバクターの検査における有用性を明らかにするために「プチットカンピロ」の培地機能について, 通常の自家調製のプレストン培地と比較検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

Campylobacter jejuni ATCC33291 (以下, *C. jejuni*), *Bacillus cereus* (以下, *B. cereus*, 患者由来株), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 (以下, *P. aeruginosa*) を供試した。

2. 使用培地

「プチットカンピロ」は 1.25 倍濃度のカンピロバクター発育サプリメント SR0232 (OXOID) 加プレストン基礎培地 (OXOID ニュートリエントブイオン No. 2 CM0067) を軟質樹脂製チューブ (10 ml) に 8 ml 分注し, 濃度調整したプレストンカンピロバクター選択サプリメント SR117 (OXOID) および 50% 馬脱繊維溶血液をそれぞれ 1 ml ずつ封入した高バリア性フィルム製の小袋を 1 個ずつ浮遊させ, γ 線照射による滅菌後, -20℃ で 1 カ月間凍結保存した。なお, 保存期間の検討には製造直後のものおよび 2 カ月, 3 カ月, 7 カ月間凍結保存したものをを用いた。使用に際しては, 常温に解凍後, チューブ内の小袋をつぶし, 十分混和し試験に供した。

「通常処方プレストン培地」は OXOID CM0067 に SR0232, SR0117 および馬溶血液を添加し, 自家調製したプレストンカンピロバクター選択増菌培地⁴⁾を 10 ml ずつ遠心管 (IWAKI 製 Centrifuge Tubes with Triple

Seal Cap 15 ml Type, 容量 16 ml) に分注し, 調整後, 24 時間以内に使用した。羊血液寒天培地は OXOID 血液寒天基礎培地 (CM055) を用いて自家調製した。バター寒天培地 (OXOID バッター処方 SR0085) および mCCDA 寒天培地 (OXOID CM0739, SR0155) は自家調製したものを使用した。

3. 培養方法

好気培養: 「プチットカンピロ」のチューブおよび「通常処方プレストン」を分注した遠心管のフタに 3 mm 大の穴を開けガスパックを用いて好気培養した。非好気培養: 「プチットカンピロ」のチューブ内の空気を極力排出し密栓して好気培養した。

4. 実験方法

1) 「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン培地」における *C. jejuni* 発育能の比較

C. jejuni は羊血液寒天培地で 37℃, 48 時間培養後, 白金耳でブルセラブロスに懸濁させ, 2.0×10^2 /ml, 2.0×10^3 /ml, 2.0×10^4 /ml の菌液を作製し, 「プチットカンピロ」10 ml および「通常処方プレストン培地」10 ml の入った遠心管に各 100 μ l を接種した。それらの最終濃度は, 2.0×10^0 /ml (2.0×10^2 /ml を各培地の 1/100 容量接種), 2.0×10^1 /ml (2.0×10^3 /ml を各培地の 1/100 容量接種) 2.0×10^2 /ml (2.0×10^4 /ml を各培地の 1/100 容量接種) であった。ふたに穴を開けた培地は好気状態で, 密栓した培地は好気条件下で 35℃, 24 時間で培養し, その培養液をブルセラブロスで適宜希釈し, 羊血液寒天培地に 100 μ l 塗布した。42℃, 48 時間好気培養した後, 発育したコロニー数を測定した。実験は $N=2$ で実施し平均値をもって検査結果とした。

2) 「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン培地」における夾雑菌混合時の *C. jejuni* 発育能の比較

C. jejuni は羊血液寒天培地で 42℃, 48 時間培養し, 白金耳でブルセラブロスに懸濁させ, 菌液を作製した。*P. aeruginosa* と *B. cereus* は, まず継代培養した後, ブレインハートインフュージョンブロスに懸濁させ各濃度の菌液を作製した。そして, *C. jejuni* と *P. aeruginosa* または *B. cereus* の混合接種量が, 条件 1: 10^1 /ml: 10^4 /ml, 条件 2: 10^1 /ml: 10^3 /ml および条件 3: 10^1 /ml: 10^2 /ml になるように混合した菌液を作製した。それらを「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン培地」10 ml の入った遠心管に 1 ml 接種し, 42℃ で 24 時間好気および非好気培養した。*B. cereus* および *P. aeruginosa* の検出には, 培養液の原液を 200 μ l ずつ SCD 寒天培地に塗布し, 35℃, 24 時間好気培養し, 発育したコロニー数を計測した。増菌培養後の *C. jejuni* の検出は, 培養液を段階希釈し, mCCDA 寒天培地に塗布し, 42℃, 48 時間好気培養し, 発育したコロニー数を測定した。実験は $N=2$ で実施し平均値をもって検査結果とした。

3) 「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン培地」における糞便検体中の *C. jejuni* の発育能の比較

まず、健常者の糞便 16 検体について、「通常処方プレストン培地」で 42°C、24 時間増菌後、mCCDA 培地で 42°C、48 時間塗沫培養し *C. jejuni* が検出されないことを確認した。そして、その糞便 1 g から 3 g をそれぞれ 3 倍量の滅菌生理食塩水に懸濁後、プールして最終的に約 10 倍希釈濃度の糞便懸濁液 10 ml を作製した。*C. jejuni* は羊血液寒天培地で 42°C、48 時間培養し、白金耳でブルセラブロスに懸濁させ、段階希釈した。作製した *C. jejuni* 菌液を、糞便懸濁液 4.5 ml に、500 μ l 接種し、約 10^1 /ml、 10^2 /ml および 10^3 /ml の *C. jejuni* 懸濁糞便液を調製した。それらを 100 μ l ずつ「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン培地」に接種し、42°C、24 時間微好気および非微好気培養した。増菌培養後の *C. jejuni* の検出は、増菌液を希釈し mCCDA 寒天培地に塗布し、42°C、48 時間微好気培養し、発育したコロニー数を測定した。実験は $N=2$ で実施し平均値をもって検査結果とした。

4) 「通常処方プレストン培地」の液量の違いにおける *C. jejuni* の発育能の比較

以下の 6 通りの培養形態を設定し、それらにおける *C. jejuni* の発育態度を調べた。①培地量 10 ml、非微好気培養（密栓、好気）②培地量 13 ml、非微好気培養（密栓、好気）③培地量 15.4 ml、非微好気培養（密栓、好気）④培地量 16 ml、非微好気培養（密栓、好気）⑤培地量 10 ml、微好気培養（穴あり）⑥培地量 10 ml、好気培養（穴あり）（図 1）

C. jejuni は羊血液寒天培地で 42°C、48 時間培養後、白金耳でブルセラブロスに懸濁し、 7.3×10^3 /ml に希釈し、①から⑥の培地にそれぞれ 1/100 容量になるように接種した。35°C、24 時間微好気もしくは非微好気培養し、培養液を適宜希釈して羊血液寒天培地に塗沫後、42°C、48 時間微好気培養し菌数を計測した。実験は $N=2$ で実施し平均値をもって検査結果とした。

さらに、①から⑥の培養液について、酸化還元電位を調べた。酸化還元電位の測定は、デジタル pH/mV 計 pH-208 (Lutron) と標準電極として ORP-14 (銀/塩化銀電極: 3.3 M 塩化カリウム溶液) を用いた。実験は $N=3$ で実施し平均値をもって検査結果とした。

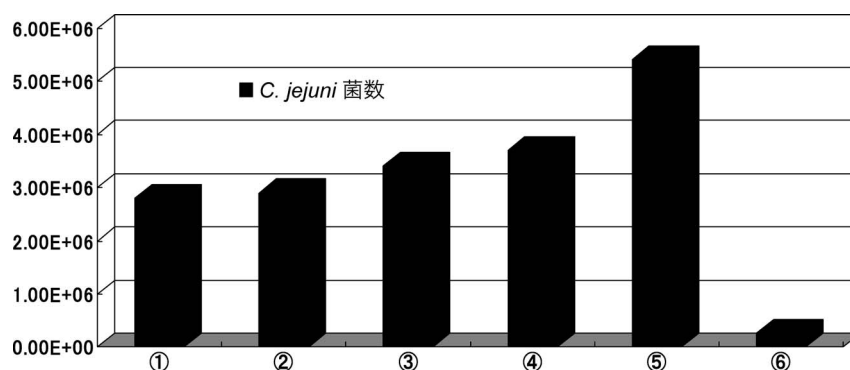
5) 「プチットカンピロ」の保存試験

「プチットカンピロ」を -20°C に保管して、製造 2 カ月後、3 カ月後および 7 カ月後において、それぞれの時点における製造直後の製品と保存品に *C. jejuni* と *P. aeruginosa* を接種し、35°C、24 時間微好気培養した。*C. jejuni* は培養液を適宜希釈して羊血液寒天培地に塗沫し、35°C、24 時間微好気培養し菌数を計測し、それらにおける増殖態度を比較検討した。*P. aeruginosa* は培養液の原液を 200 μ l ずつ SCD 寒天培地に塗布し、35°C、24 時間好気培養し、発育したコロニー数を計測した。*C. jejuni* 接種菌液は羊血液寒天培地で 37°C、48 時間培養し、白金耳でブルセラブロスに懸濁させ、作製した。*P. aeruginosa* は、ブレインハートインフージョンブロスに懸濁させ 10^3 /ml の菌液を作製した。実験は $N=2$ で実施し平均値をもって検査結果とした。

結 果

1. 「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン培地」における *C. jejuni* 発育能の比較

35°C、24 時間微好気培養した結果、表 1 に示すように「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン」で接種菌量が 2.0×10^0 /ml では 6.1×10^4 /ml、 8.3×10^4 /ml、接種菌量が 2.0×10^1 /ml では 7.6×10^5 /ml、 5.9×10^5 /ml および接種菌量が 2.0×10^2 /ml では 8.8×10^6 /ml、 3.6×10^6 /ml であった。「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン」の微好気培養における *C. jejuni* の増殖態度は同等の傾向を示した。「プチットカンピロ」の非微好気培養では接種菌量 2.0×10^0 /ml で 3.3×10^4 /ml、接種菌量 2.0×10^1 /ml で 2.5×10^5 /ml および接種菌量 2.0×10^2 /ml で 2.2×10^6 /ml であり、前 2 者と同等であった。



①培地量 10 ml (密栓, 非微好気), ②培地量 13 ml (密栓, 非微好気), ③培地量 15.4 ml (密栓, 非微好気), ④培地量 16 ml (密栓, 非微好気), ⑤培地量 10 ml 微好気培養 (穴あり), ⑥培地量 10 ml 非微好気培養 (穴あり)

図 2. 通常処方プレストン培地の培養形態における *C. jejuni* 増殖態度

表 1. 培養方法ごとに検討比較した *C. jejuni* 単独培養の増殖態度

培地名 ^{*1}	培養方法	接種菌量		
		$2.0 \times 10^0/ml$	$2.0 \times 10^1/ml$	$2.0 \times 10^2/ml$
通常プレストン	微好気	$8.3 \times 10^4/ml$	$5.9 \times 10^5/ml$	$3.6 \times 10^6/ml$
ブチットカンピロ	微好気	$6.1 \times 10^4/ml$	$7.6 \times 10^5/ml$	$8.8 \times 10^6/ml$
ブチットカンピロ	非微好気培養 ^{*2}	$3.3 \times 10^4/ml$	$2.5 \times 10^5/ml$	$2.2 \times 10^6/ml$

培養条件: 35°C, 24 時間 判定: 羊血液寒天培地で 42°C, 48 時間培養後菌数測定

*1 培地容量 10 ml

*2 チューブから 90% 以上空気を追い出した状態で, 密栓し好気培養

表 2. 培養方法ごとに検討比較した *C. jejuni* と夾雑菌の混合培養 (1)

培地名 ^{*1}	培養方法	接種菌量					
		条件 1		条件 2		条件 3	
		C.j	P.a	C.j	P.a	C.j	P.a
		$5.3 \times 10^1/ml$	$2.3 \times 10^4/ml$	$5.3 \times 10^1/ml$	$2.3 \times 10^3/ml$	$5.3 \times 10^1/ml$	$2.3 \times 10^2/ml$
通常プレストン	微好気	$1.2 \times 10^7/ml$	$1.2 \times 10^1/ml$	$1.0 \times 10^7/ml$	不検出	$1.0 \times 10^7/ml$	不検出
ブチットカンピロ	微好気	$1.4 \times 10^7/ml$	$1.3 \times 10^1/ml$	$1.2 \times 10^7/ml$	不検出	$1.4 \times 10^7/ml$	不検出
ブチットカンピロ	非微好気培養 ^{*2}	$8.4 \times 10^6/ml$	不検出	$1.9 \times 10^6/ml$	不検出	$8.3 \times 10^6/ml$	不検出

C.j: *Campylobacter jejuni* P.a: *Pseudomonas aeruginosa*

培養条件: 42°C, 24 時間 C.j 判定: mCCDA 寒天培地で 42°C, 48 時間培養後菌数測定

P.a 判定: SCD 寒天培地で 35°C, 24 時間培養後菌数測定

*1 培地容量 10 ml

*2 チューブから 90% 以上空気を追い出した状態で, 密栓し好気培養

表 3. 培養方法ごとに検討比較した *C. jejuni* と夾雑菌の混合培養 (2)

培地名 ^{*1}	培養方法	接種菌量					
		条件 1		条件 2		条件 3	
		C.j	B.c	C.j	B.c	C.j	B.c
		$5.3 \times 10^1/ml$	$2.5 \times 10^4/ml$	$5.3 \times 10^1/ml$	$2.5 \times 10^3/ml$	$5.3 \times 10^1/ml$	$2.5 \times 10^2/ml$
通常プレストン	微好気	$1.1 \times 10^6/ml$	$8.5 \times 10^1/ml$	$4.7 \times 10^6/ml$	$5.0 \times 10^0/ml$	$8.6 \times 10^7/ml$	不検出
ブチットカンピロ	微好気	$1.4 \times 10^7/ml$	$9.5 \times 10^1/ml$	$1.4 \times 10^7/ml$	$5.0 \times 10^0/ml$	$1.4 \times 10^7/ml$	不検出
ブチットカンピロ	非微好気培養 ^{*2}	$6.2 \times 10^6/ml$	$1.5 \times 10^2/ml$	$5.5 \times 10^6/ml$	$1.6 \times 10^1/ml$	$6.8 \times 10^6/ml$	不検出

C.j: *Campylobacter jejuni* B.c: *Bacillus cereus*

培養条件: 35°C, 24 時間 C.j 判定: mCCDA 寒天培地で 42°C, 48 時間培養後菌数測定

P.a 判定: SCD 寒天培地で 35°C, 24 時間培養後菌数測定

*1 培地容量 10 ml

*2 チューブから 90% 以上空気を追い出した状態で, 密栓し好気培養

表 4. 培養方法ごとに検討比較した糞便中の *C. jejuni* の増殖態度

培地名 ^{*1}	培養方法	分離培地	接種菌量		
			$7.7 \times 10^1/ml$	$7.7 \times 10^2/ml$	$7.7 \times 10^3/ml$
通常プレストン	微好気	mCCDA	$2.2 \times 10^7/ml$	$3.5 \times 10^7/ml$	$4.7 \times 10^7/ml$
ブチットカンピロ	微好気	mCCDA	$3.5 \times 10^7/ml$	$4.7 \times 10^7/ml$	$6.1 \times 10^7/ml$
ブチットカンピロ	非微好気培養 ^{*2}	mCCDA	$3.0 \times 10^7/ml$	$6.3 \times 10^7/ml$	$8.6 \times 10^7/ml$

培養条件: 35°C, 24 時間 判定: mCCDA 寒天培地で 42°C, 48 時間培養後菌数測定

*1 培地容量 10 ml

*2 チューブから 90% 以上空気を追い出した状態で, 密栓し好気培養

表5. プチットカンピロの保存試験結果

プチットカンピロ	冷凍保存期間および実験時接種菌と増殖菌量					
	2カ月後		3カ月後		7カ月後	
	C.j	P.a	C.j	P.a	C.j	P.a
		2.1×10^1	2.3×10^3	3.7×10^1	2.8×10^3	7.3×10^1
冷凍保存	1.6×10^5	不検出	5.4×10^5	不検出	2.0×10^5	不検出
製造直後	3.3×10^5	不検出	5.0×10^5	不検出	2.8×10^5	不検出

C.j: *Campylobacter jejuni* P.a: *Pseudomonas aeruginosa*

培地容量 10 ml, チューブから 90% 以上空気を追い出した状態で, 密栓し好気培養. 菌数値は 1 ml 当たり

表6. プレストン培地における培養形態ごとの *C. jejuni* 増殖態度 (菌数値と酸化還元電位)

培養形態	①	②	③	④	⑤	⑥
菌数値/ml	2.8×10^6	2.9×10^6	3.4×10^6	3.7×10^6	5.4×10^6	2.6×10^5
酸化還元電位測定値 mV	149	115	101	82	69	177

①培地量 10 ml (密栓, 非好気), ②培地量 13 ml (密栓, 非好気), ③培地量 15.4 ml (密栓, 非好気),

④培地量 16 ml (密栓, 非好気), ⑤培地量 10 ml 好気培養 (穴あり), ⑥培地量 10 ml 非好気培養 (穴あり)

2. 「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン培地」における夾雑菌混合時の *C. jejuni* 発育能の比較

C. jejuni と *P. aeruginosa* を 42°C, 24 時間培養した結果は表 2 に示すように, 条件 1, 条件 2 および条件 3 において *C. jejuni* の菌量は「プチットカンピロ」好気培養ではそれぞれ 1.4×10^7 /ml, 1.2×10^7 /ml および 1.4×10^7 /ml に, 「通常プレストン培地」好気培養ではそれぞれ 1.2×10^7 /ml, 1.0×10^7 /ml および 1.0×10^7 /ml であった。「プチットカンピロ」非好気培養では, 条件 1 で 8.4×10^6 /ml, 条件 2 で 1.9×10^6 /ml および条件 3 で 8.3×10^6 /ml であった。*P. aeruginosa* は 2.3×10^3 /ml および 2.3×10^2 /ml の接種菌量では 24 時間後には検出限界以下まで菌数が減少した。 2.3×10^4 /ml の接種菌量では $1.2 \sim 1.3 \times 10^1$ /ml と接種菌量の 0.1% 以下に減少した。

C. jejuni と *B. cereus* を 42°C, 24 時間培養した結果, 表 3 に示すように条件 1, 条件 2 および条件 3 において *C. jejuni* は「通常プレストン培地」好気培養で 1.1×10^6 /ml, 4.7×10^6 /ml および 8.6×10^7 /ml に, 「プチットカンピロ」好気培養では 1.4×10^7 /ml, 1.4×10^7 /ml および 1.4×10^7 /ml に増殖し, 「プチットカンピロ」非好気培養では 6.2×10^6 /ml, 5.5×10^6 /ml および 6.8×10^6 /ml に増殖した。*B. cereus* は, 接種菌量 2.5×10^2 /ml ではいずれの培養条件においても検出されなかったが, 2.5×10^3 /ml および 2.5×10^4 /ml 接種した場合, 5.0×10^0 /ml から 1.5×10^2 /ml 検出された。

3. 「プチットカンピロ」および「通常処方プレストン培地」における糞便検体中の *C. jejuni* の発育能の比較

42°C, 24 時間好気培養した「プチットカンピロ」に

おいては, 表 4 に示すように, 7.7×10^1 /ml では 3.5×10^7 /ml に, 7.7×10^2 /ml 接種では 4.7×10^7 /ml に, 7.7×10^3 /ml 接種では 6.1×10^7 /ml に増菌した。「通常処方プレストン培地」好気培養では接種菌量が 7.7×10^1 /ml では 2.2×10^7 /ml に, 7.7×10^2 /ml 接種では 3.5×10^7 /ml に, 7.7×10^3 /ml 接種では 4.7×10^7 /ml に増菌した。「プチットカンピロ」非好気培養では接種菌量が 7.7×10^1 /ml では 3.0×10^7 /ml に, 7.7×10^2 /ml 接種では 6.3×10^7 /ml に, 7.7×10^3 /ml 接種では 8.6×10^7 /ml に増菌した。前 2 者と同等であった。

4. 「通常処方プレストン培地」の液量の違いにおける *C. jejuni* の発育能の比較

培養形態①培地量 10 ml, ②培地量 13 ml, ③培地量 15.4 ml および④培地量 16 ml の非好気培養 (密栓, 好気) では, 表 5 に示すように, 試験管内の空気容量の減少と培地容量の増加に比例して, 菌数が上昇する傾向を示した。しかし, 培養形態⑤の培地量 10 ml 好気培養 (穴あり) には若干及ばなかった。培養形態⑥培地量 10 ml 好気培養 (穴あり) は①から⑤で最少の 2.8×10^6 /ml と比して 1 オーダー少なかったが, 2.6×10^5 /ml と菌の増殖が認められた。

培養形態①～⑥における酸化還元電位を調べたところ, 表 5 に示すように, 酸化還元電位は⑤培地量 10 ml, 好気培養が最も低く⑥培地量 10 ml, 好気培養が最も高かった。①～④の非好気培養 (密栓, 好気) では試験管中の空気が少ないほど低下し, 酸化還元電位が低くなるに従って, 発育菌量が増加した。

5. 「プチットカンピロ」の保存試験

プチットカンピロの当日製造品と冷凍保存品について *C. jejuni* 発育能を比較検討した。表 6 に示すように, 増菌培養後の *C. jejuni* 菌数は 2 カ月保存試験では $2.1 \times$

10¹/ml 接種で、製造直後培地が 3.3×10⁵/ml、保存培地が 1.6×10⁵/ml であった。3 カ月保存試験では、3.7×10¹/ml 接種で、製造直後培地が 5.0×10⁵/ml であった。保存培地が 5.4×10⁵/ml、7 カ月保存試験では 7.3×10¹/ml 接種で、製造直後培地が 2.8×10⁵/ml、保存培地が 2.0×10⁵/ml であった。*P. aeruginosa* はいずれの保存試験期間においても検出されなかった。

考 察

今回の研究に用いたカンピロバクター選択増菌培地プチットカンピロは、通常処方プレストン培地の製造単位が 500 ml であり、調製時間は数時間かかるのに対し、10 ml 単位で、数秒で子袋を指でつぶすだけで簡易に調整できる。培地の保存期間は、通常処方プレストン培地では 4°C、1 週間とされているが、プチットカンピロは今回の保存試験の結果、−20°C の凍結状態で少なくとも 7 カ月間性能が保持されることが確認された。また、糞便における実験では、「プチットカンピロ」は微好気培養および非微好気培養いずれも「通常プレストン培地」の微好気培養と同等の *C. jejuni* 発育を示し、糞便からの *C. jejuni* 検出に応用できる結果を得た。「プチットカンピロ」は簡易な調整と長期間の保存性によって食中毒発生時等の検査現場における緊急時の *C. jejuni* 検査に有用と考えられる。

「プチットカンピロ」非微好気培養では、*C. jejuni* が「プチットカンピロ」微好気培養と同等に発育した。このことから、微好気培養用容器や専用の試薬を用いないで *C. jejuni* の検査ができる可能性が示唆された。「プチットカンピロ」非微好気培養は 90% 以上空気が排出された状態なので、結果的に微好気条件（酸素濃度 3~5%¹⁾）下で培養した場合と同等の培養条件であったことが推察される。このことは、酸化還元電位の測定結果からも推察された。また、*C. jejuni* が有する酸化ストレスに対し機能すると考えられる各種の還元酵素活性^{2, 3, 5~7, 12)} が *C. jejuni* の発育に寄与したことも推察される。

夾雑菌 *B. cereus*, *P. aeruginosa* に対する発育抑制能に関しては、「プチットカンピロ」および「通常プレストン培地」の微好気培養は同程度の性能を示した。「プチットカンピロ」非微好気も同等の発育抑制性能を示した。

今後、微好気培養の器具や試薬を必要としないで迅速に *C. jejuni* の検出が可能となる検査体系を実現するために、PCR 法と組み合わせた検査法の検討をしたい。

結 論

「プチットカンピロ」は通常プレストンと同等の培地機能を持ち、冷凍により長期間保存できることが確認された。使用時に必要数を非常に簡易に調整できることから、検査機関におけるカンピロバクター検査に有用と考えられる。さらに、「プチットカンピロ」によるカンピロバクター検査において、微好気培養を必要としない密栓

培養を選択することも可能と考えられる。その際、チューブ容器内の空気をできるだけ排出したほうがより微好気培養に近いカンピロバクターの発育が期待できる。

文 献

- 1) Atack, J. M., Harvey, P., Jones, M. A. and Kelly, D. J.: The *Campylobacter jejuni* thiol peroxidases Tpx and Bcp both contribute to aerotolerance and peroxide-mediated stress resistance but have distinct substrate specificities. *J. Bacteriol.*, **190**, 5279–5290 (2008).
- 2) Atack, J. M. and Kelly, D. J.: Contribution of the stereospecific methionine sulphoxide reductases MsrA and MsrB to oxidative and nitrosative stress resistance in the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **154**, 2219–2230 (2008).
- 3) Baillon, M. L., van Vliet, A. H., Ketley, J. M., Constantinidou, C. and Penn, C. W.: An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.*, **181**, 4798–4804 (1999).
- 4) Bolton, F. J. and Robertson, L.: A selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.*, **35**, 462–467 (1982).
- 5) Bolton, F. J., Coates, D. and Hutchinson, D. N.: The ability of *Campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 151–157 (1984).
- 6) Grant, K. A. and Park, S. F.: Molecular characterization of *katA* from *Campylobacter jejuni* and generation of a catalase-deficient mutant of *Campylobacter coli* by interspecific allelic exchange. *Microbiology*, **141**, 1369–1376 (1995).
- 7) Hoffman, P. S., George, H. A., Krieg, N. R. and Smibert, R. M.: Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 8–16 (1979).
- 8) 伊藤 武: I 総論, 食品衛生検査指針, 厚生労働省監修, p. 229, 日本食品衛生協会, 東京 (2004).
- 9) 厚生省食品衛生課長通知: ナグビブリオ, カンピロバクター等の食品衛生上の取扱いについて. 昭和 57 年 3 月 11 日, 環食第 59 号 (1982).
- 10) 小野一晃, カンピロバクター, モダンメディア, **54**, 159–163 (2008).
- 11) 小野一晃, 安藤洋子, 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).
- 12) van Vliet, A. H., Baillon, M. A., Penn, C. W. and Ketley, J. M.: The iron-induced ferredoxin FdxA of *Campylobacter jejuni* is involved in aerotolerance. *FEMS Microbiol. Lett.*, **196**, 189–193 (2001).
- 13) 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).