

食品検査用簡易調製カンピロバクター増菌培地 「プチットカンピロ／225(プレストン)」の紹介

(株)日研生物医学研究所

百武晃宏、加藤孝広、梅迫誠一

はじめに

カンピロバクター食中毒の発生件数はノロウイルスに次いで二番目に多く、細菌性の中では最も多い。この傾向は10年間続いており、食中毒全体に占める割合は増加傾向にある。

食品等からカンピロバクターを検出する際、選択増菌培地であらかじめ増菌したあと、選択分離平板培地で分離する方法が一般的である。しかし、増菌培地の調製は、基礎培地の滅菌後に血液やサプリメントの添加が必要であり、さらにそれらの管理・調製など、繁雑なことが課題とされてきた。

そこで弊社は、拭き取り材料、患者糞便などのカンピロバクター検査用として、容器内の小袋をつぶすだけで簡易調製できるプレストン処方増菌培地「プチットカンピロ／10（プレストン）」を開発し、本誌2008年7月号¹⁾および2009年4月号²⁾において紹介した。

一方、食品のカンピロバクター検査ではサンプルとして25 g若しくは10 gを用いることが一般的である。増菌培地は前者では225ml若しくは100 ml、後者では90mlが必要とされる。今回弊社では、食品のカンピロバクター検査に使用することを目的とした、「プチットカンピロ／225（プレストン）」（以下「プチットカンピロ／225」）を開発したので、その使用方法と製品性能を紹介する。

「プチットカンピロ／225」の商品形態

「プチットカンピロ／225」の形態は図に示す（図1－A）。

容器は介助なしで自立可能なバリア性の袋である。内容は粉末状態の基礎培地と、袋内上部に固定された高バリア性1フィルム製小袋二個より構成されている。高バリア性フィルム製小袋の内容物は力価が不安定なカンピロバクター発育支持剤、夾雑菌抑制剤、および単体保管や秤量分注することが困難な馬脱繊維溶血液である。小袋の形態とした目的は、調製を簡易化することおよびこれらの内容物を使用直前まで基礎培地と分離することで長期間の保存性を可能にすることである。（現在保存試験を実施中）。

「プチットカンピロ／225」の性能比較(カンピロバクターの発育態度と夾雑菌の発育抑制)

「プチットカンピロ／225」は、通常処方プレストン培地（以下、通常処方培地）と比較して簡易に調製できるように工夫されているので、培地の調製手順が通常処方培地と異なる。そこで「プチットカンピロ／225」のカンピロバクター発育能および夾雑菌発育抑制能を、通常処方培地と比較検討した。比較試験は、通常処方培地および「プチットカンピロ／225」を調製し樹脂製チューブ

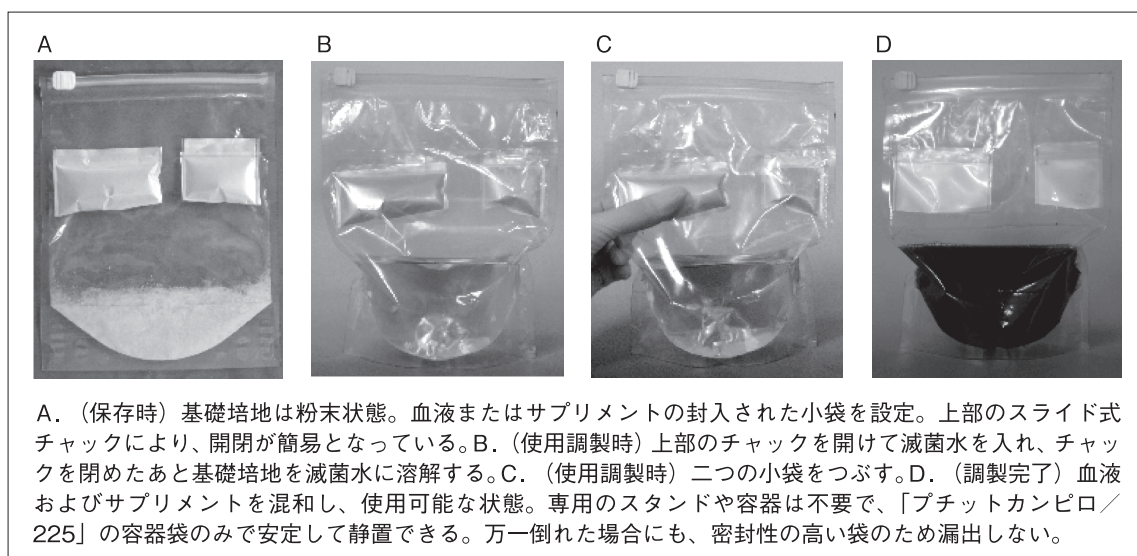


図1 「プチットカンピロ/225（プレストン）」の形態と使用方法

に10ml分注したものにカンピロバクター標準菌株 (*C. jejuni* ATCC 33291) を接種し、微好気条件で42℃、24時間増菌培養し、平板培地上のコロニー数を測定した。

単独培養したカンピロバクターは通常処方培地および「プチットカンピロ／225」の調製済み培地の両者で、約 10^1 ／mlおよび 10^2 ／ml接種時に $10^7 \sim 10^9$ ／mlのオーダーまで増菌され、概ね同等であった。

夾雑菌の発育抑制および夾雑菌存在下でのカンピロバクター発育を比較検討するため、カンピロバクターを緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) または枯草菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) と1:1000の比率でそれぞれ混合し、各培地に接種後、微好気培養した。その結果、「プチットカンピロ／225」調製済み培地において緑膿菌及び枯草菌は1ml中に検出されず、通常処方培地と同等、あるいはそれ以上の発育抑制能を示した。なお両培地において、カンピロバクターはいずれの夾雑菌存在下でも、発育を確認された(表2)。

以上のことから、「プチットカンピロ／225」調製済み培地は、発育支持及び夾雑菌の発育抑制において、通常処方培地と概ね同等の性能であることが示唆された。

表1 通常処方プレストン培地および「プチットカンピロ／225」での*C. jejuni*の発育態度

培地形態	接種菌量	
	4.2×10 ¹ ／ml	4.2×10 ² ／ml
プチットカンピロ／225	1.5×10 ⁷ ／ml	4.1×10 ⁷ ／ml
通常処方培地	6.5×10 ⁷ ／ml	1.2×10 ⁸ ／ml

培養条件：増菌培養は微好気条件において、42℃、24時間。
増菌後の培養液は希釈後、羊血液寒天培地に塗布し、
微好気条件において、42℃、48時間

「プチットカンピロ／225」による鶏肉の カンピロバクター検査結果

「プチットカンピロ／225」の食品検査への使用を検討した。ここまでは微好気条件下で標準菌株を培養したのに対し、食品検査では市販鶏肉(モモ肉)を汚染するカンピロバクターの増菌を試みた。また、「プチットカンピロ／10 (プレストン)」で示した²⁾のと同様に、「プチットカンピロ／225」を用いた密封状態の非微好気培養による増菌の可能性を探った。

鶏肉を滅菌はさみで細かく刻み、均一化した後、任意に25gを225mlの通常処方培地および「プチットカンピロ／225」に接種した。前者は微好気条件で、後者は空気を排出・密封し非微好気条件で、42℃、24時間培養した。増菌培養後、mCCDA選択分離培地に塗布し42℃で48時間培養し、カンピロバクターを同定した。

表2 混合培養における*C. jejuni*の発育と夾雑菌の発育抑制

培地形態	<i>C. jejuni</i> と <i>P. aeruginosa</i> の混合		<i>C. jejuni</i> と <i>B. subtilis</i> の混合	
	<i>C. jejuni</i> 接種菌量	<i>P. aeruginosa</i> 接種菌量	<i>C. jejuni</i> 接種菌量	<i>B. subtilis</i> 接種菌量
	$2.1 \times 10^1 / \text{ml}$	$5.5 \times 10^4 / \text{ml}$	$2.1 \times 10^1 / \text{ml}$	$5.0 \times 10^4 / \text{ml}$
プチットカンピロ／225	$1.8 \times 10^7 / \text{ml}$	10未満／ml	$1.1 \times 10^7 / \text{ml}$	10未満／ml
通常処方培地	$3.0 \times 10^7 / \text{ml}$	10未満／ml	$3.7 \times 10^7 / \text{ml}$	10未満／ml

培養条件：増菌培養は微好気条件において、42℃、24時間。カンピロバクターの検出は希釈した培養液をmCCDA培地に塗布後、微好気条件において、42℃、48時間。*P. aeruginosa*および*B. subtilis*の検出は培養液をSCD寒天培地に塗布後、35℃、24時間

表3 低温保存した*C. jejuni*の「プチットカンピロ／225」における発育態度

培地形態	接種菌量	
	$4.2 \times 10^2 / \text{ml}$	$4.2 \times 10^3 / \text{ml}$
プチットカンピロ／225	$3.0 \times 10^7 / \text{ml}$	$9.2 \times 10^7 / \text{ml}$
通常処方培地	$1.3 \times 10^7 / \text{ml}$	$8.0 \times 10^7 / \text{ml}$

菌の保存条件：*C. jejuni*をPBSに懸濁し濃度調整したものを、微好気条件下において4℃で15日間保存した。

培養条件：増菌培養は微好気条件において、42℃、24時間。増菌後の培養液は希釈後、羊血液寒天培地に塗布し、微好気条件において、42℃、48時間

通常処方培地および「プチットカンピロ／225」において、10検体中8検体のカンピロバクターを検出した。また、増菌後のカンピロバクターの菌数は、同等であった。このことから、「プチットカンピロ／225」を用いた非微好気培養は、食品検査にも使用できることが示唆された。

カンピロバクター標準菌株に対しても食品検査を想定した条件における増菌培養を行い、培地の性能を比較した。市販鶏肉はカンピロバクター検出率が高い食品として報告されており、通常は冷凍もしくは冷蔵状態で流通する。今回は冷蔵条件下にある菌に対する増菌性能を確認するため、カンピロバクター菌浮遊液を4℃で15日間保存したものを供試菌株に用いた。樹脂製チューブに分注した10mlの培地にカンピロバクター標準菌株を接種し、微好気条件で42℃、24時間増菌培養し、平板培地上のコロニー数を測定した。その結果通常処方培地および「プチットカンピロ／225」調製済み培地の両方で約 $10^2 / \text{ml}$ および $10^3 / \text{ml}$ 接種時に $10^7 / \text{ml}$ のオーダーまで増菌され、両培地間には差は認められなかった（表3）。

「プチットカンピロ／225」の使用方法和有用性

「プチットカンピロ／225」の調製方法は、通

常処方培地に比べ、大変簡便である。基礎培地は粉末状態であるため、調製の際には最初に容器袋に滅菌水225mlを注いで基礎培地粉末を溶解する（図1－B）。その後、二つの小袋を潰し、血液やサプリメントを混合（図1－C）すれば調製完了である。サンプルは、容器袋の上部に備えられたスライド

式チャックを開口し、培地内へ接種する。そして、出来る限り容器内の空気を排出し、密封状態で培養することが出来る。また、培養時には専用のホルダーを必要とせず、容器袋のみで安定して自立させることが出来る。（図1－D）

「プチットカンピロ／225」は調製が簡便であることから、突然の検査要求にも即座に対応することが可能である。また、血液およびサプリメントの管理をほとんど必要とせず、検体数に応じた必要な分量を用事調製できることや、微好気培養のための器具や試薬が不要なことから、本製品の使用によりカンピロバクター検査のコストダウンが期待される。

さらに、「プチットカンピロ／225」で培養後、市販のカンピロバクター検出キット（イムノクロマト）やPCR法と併用することで、増菌から同定まで一貫して微好気培養を必要とせず、迅速に結果を得られることが期待される。

〔本製品は、近日新発売の予定です〕

参考文献

- 1) 新製品プレストン処方カンピロバクター増菌培地「プチットカンピロ」の紹介
月刊HACCP 2008年7月号 P.107-109
- 2) 新製品プレストン処方カンピロバクター増菌培地「プチットカンピロ」の紹介
第2報 既存培地との性能比較とその使用方法について
月刊HACCP 2009年4月号 P.106-109

問い合わせ先

株式会社 日研生物医学研究所
京都府久世郡久御山町大橋辺外縁23番地
TEL 075-631-6187、FAX 075-632-0367
URL <http://www.nikken-bio.co.jp>
E-mail info@nikken-bio.co.jp