

カンピロバクター・ジェジュニ/コリ試験法

コラボスタディー実行案 (NIHSJ-02-ST3)

2011.10.31 検討委員会確認

目 次

1. コラボ試験法案提案の背景
2. コラボ試験の目的
3. コラボ試験の参考引用規格
4. 実施予定試験機関数
5. 試験方法
6. 試験検体
7. 試験菌株
8. 菌接種検体の調製
9. 検体の輸送
10. 試験
 11. 試験検体の処理方法
 12. コラボ試験に関連する培地などの郵送
 13. コラボ実施機関で行う試験概要
 14. 試験結果の提出
 15. 統計

別添. カンピロバクター・ジェジュニ/コリ試験法
(ステージ3 : コラボ案) NIHSJ-02-ST3 案

1. コラボ試験法案提案の背景

カンピロバクターによる食中毒は事件数・患者数共に非常に多い細菌性食中毒であり依然として減少はみられず、むしろ増加傾向にある。その根本的な対策が求められているが、国内ではカンピロバクターに関する食品の規格基準がないため、公定法に相当するカンピロバクターの試験法はない。一方、カンピロバクターの分離培養は試験法や試験者の手技などの影響を受けやすいことが知られており、信頼性の高い標準試験法を早急に整備する必要がある。食品における汚染実態調査においても統一された試験法の整備が求められている。カンピロバクターレファレンスセンターを中心にこれまで行われてきたカンピロバクター・ジェジュニ／コリの試験法案の検討の成果により、検討委員会では現在作業部会案として NIHSJ-02-ST2 を公開している。カンピロバクターレファレンスセンターは、その後数回のプレラボを行い、標準試験法案がほぼ固まりつつある。プレラボとしては、カンピロバクター・ジェジュニ株を用いて、市販の鶏肉に予め菌量の分かっているジェジュニ（①多い、②少ない、③なし、それぞれ n=3）をスパイクしたものを冷蔵と冷凍の鶏肉検体を用意し、2種類の増菌培地（プレストンとボルトン）、2種類の分離培地（mCCDA とバツラー）を用いてその培地の有効性を検討してきた。また同時にカンピロバクターの培養条件に関して、微好気条件についても検討を進めてきた。最終試験法を確定するにあたり、これまで検討したプレラボの成績から、コラボ案を作成し、その評価を検討委員会に諮問する。標準試験法検討委員会により確認されたコラボ案を基にコラボ実施機関を公募し、コラボ試験を実施する予定である。得られたコラボの結果から、信頼性の高い標準試験法最終案を提案する予定である。

2. コラボ試験の目的

食品流通経済のグローバル化にある現状を背景として、国際的に互換性のある試験を行うことは重要であり、このような観点からカンピロバクター・ジェジュニ／コリの標準試験法について検討を行ってきた。

本コラボ試験においては、カンピロバクターレファレンスセンターの検討してきたカンピロバクター・ジェジュニ／コリ試験法について評価することを目的とする。本試験においては、ボルトン培地を用いた試験法 ISO 10272-1:2006 を参照法として、カンピロバクターレファレンスセンターの策定した試験法（プレストン培地 100ml による増菌法）を妥当性確認することを目的とする。

3. コラボ試験の参考引用規格

国際的に通用する検証を実施するために、代替試験法の妥当性確認の国際規格である ISO16140 に準拠し、また、ISO の考え方を取り入れている AOAC 法のコラボスタディーの実施例を参照し実行する。

4. 実施予定試験機関数

最大 15 ヶ所程度で実施予定

5. 試験方法

ISO 10272-1:2006 を参照法とし、カンピロバクターレファレンスセンターの検討したプレストン培地を用いた増菌試験法について、使用培地等試験法詳細を特定して選択増菌培養および選択分離培養による定性試験を行い、代替法としての妥当性確認を行う。

6. 試験検体

本試験においては、カンピロバクター・ジェジュニ／コリによる危害の可能性が高い鶏肉を用いて試験を行う。食品検体は鶏肉 1 種類につき行う。検体となる鶏肉は、市販の鶏のミンチ肉を用いる。ミンチ肉は凍結融解を繰り返したのち凍結で保管し、カンピロバクターが検出されないことを確認後、7 に述べる菌株を 8 に述べる菌数で人工的に接種する。検体は凍結された状態で配布する。

7. 試験菌株

本試験ではカンピロバクター・ジェジュニ NCTC11168 菌株を使用する。菌株は保護剤である Maximum Recovery Diluent にけん濁して用いる。

8. 菌接種検体の調製

スパイクによる 2 段階の菌量レベルを検討する。微好気培養を必要とするため、1 度
に実施可能な検体数は限定されるため、以下の実験を 2 回繰り返して実施する。菌液
濃度は

- ① 10⁹ CFU / g × 3 サンプル
- ② 1⁹ CFU / g × 3 サンプル
- ③ 非スパイク試料 × 3 サンプル

9. 検体の輸送

ドライアイスにて -20℃ 以下(冷凍)に保って輸送し、各試験室に到着後は -20℃ 以下
に保存する。温度記録をとる。

10. 試験

別添のプロトコールによる。選択増菌培地としてはボルトン培地とプレストン培地を
用いる。選択分離培地としては、mCCDA 培地とバツラー培地を用いる。
試験は、試料が到着後可能な限り速やかに開始する。

1 1. 試験検体の処理方法

- ① 試料の包装表面をアルコール綿で拭く。
- ② 滅菌したピンセット、ハサミを用い、包装を開く。
- ③ 試料 25g をストマッカー袋に入れる。
- ④ 選択増菌培地 ボルトンは 225 ml (プレストンは、100 ml) を加え、1 分間ストマッキングして、乳剤とする。

注：コラボでは、検体をストマッカー袋で配布予定のため、①～③は省略

1 2. コラボ試験に関連する培地などの郵送

プレストン、ボルトン、バツラー、mCCDA など必要な培地およびサプリメント、血液等を国立医薬品食品衛生研究所で一括購入し、必要な分を各コラボ実施機関に前もって郵送する。

1 3. コラボ実施機関で行う試験概要

- (1) サンプルの処理：それぞれの 25 g 検体に、選択増菌培地として、プレストン (100 ml) またはボルトン(225 ml)を加えてホモジネートする。
- (2) ボルトンの場合は微好気条件下にて $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 4 時間培養後に、 $41.5\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 24-44 時間培養する。24 および 44 時間後に選択培地に接種する。プレストンの場合は微好気条件下にて $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 24-48 時間培養する。24 および 48 時間後に選択培地に接種する。微好気条件は各機関が選択して行う。
 - ①微好気ガスの組成の条件を維持できるもの
 - ②市販の微好気ジャーシステム (ガスキットシステムなど) を利用する。
 - ③通気性のない材質の容器または袋を使用し、密閉する。
- (3) 分離培養培地 (バツラーおよび mCCDA、各 2 枚ずつ) に増菌培養した液を 1-2 白金耳画線塗抹し、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ ($41.5\pm 1^{\circ}\text{C}$) にて 24-48 時間培養する。(1 日 (24h) 後、2 日後(44-48h)に各 2 枚ずつ接種)
- (4) 成育したコロニーの形態観察を行い、カンピロバクターと思われるコロニーの有無を調べる。

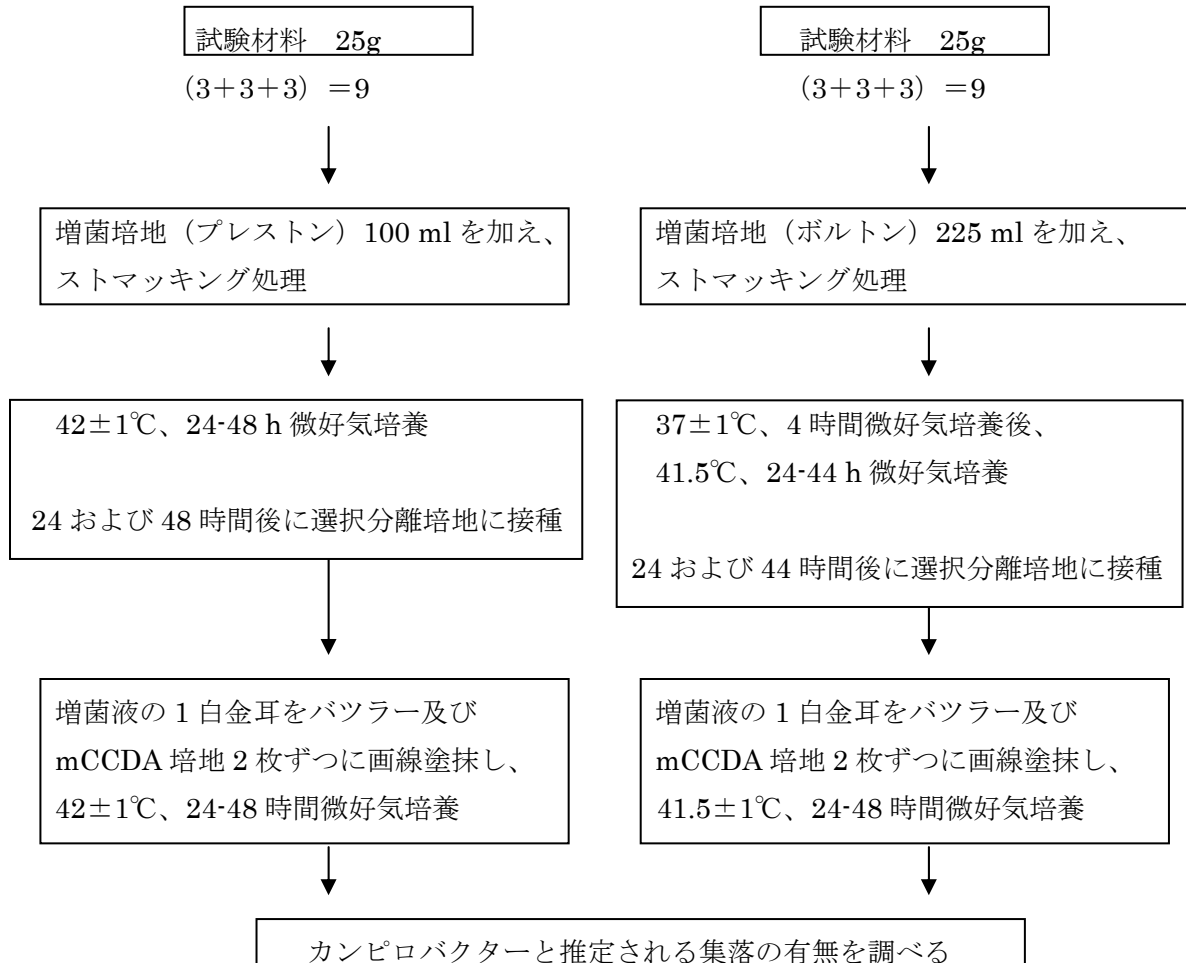
1 4. 試験結果の提出

試験結果は、配布した記入表に試験結果を記入して、解析担当者に提出する。

1 5. 統計

定性試験の解析法を用い、評価する。

カンピロバクターの試験法検討のフロー



別添. カンピロバクター・ジェジュニ／コリ試験法

(ステージ3 : コラボ案) NIHSJ-02-ST3

1. カンピロバクター・ジェジュニ・コリの定義

本試験法でいうカンピロバクター・ジェジュニ・コリは、ISO 10272-1:2006 で述べる選択培地上で微好気培養を行った場合、25℃では集落を形成せず、41.5℃で特徴的な集落を形成する細菌で、運動性を持ち、ISO 10272-1:2006 で述べる生化学的性状と一致するものをいう。

2. 試験の概要

本試験は、試料中にカンピロバクター・ジェジュニ／コリが存在するかを、選択増菌培地にて増菌させた後、選択分離培地上に接種し、形成されたカンピロバクター・ジェジュニ／コリの集落を確認する定性試験法である。試料を 25 g 秤量し、プレストン増菌培地 100 ml を加えて均質化し、微好気培養により増菌した後、その 1 白金耳量をそれぞれ 2 枚の選択分離平板培地に塗抹、微好気培養し、カンピロバクター・ジェジュニ／コリの集落を形成させる。選択分離培地として ISO 10272-1:2006 で指定する mCCDA 培地と他の選択分離培地を用いる。コラボではバツラー培地を用いる。疑わしい集落は、純培養を行った後、生化学性状を確認し同定する。

3. 使用機器、器具

- ① 乾熱滅菌器、オートクレーブ
- ② ふらん器 (37 ± 1℃、42 ± 1℃ (41.5 ± 1℃)) この場合は市販の微好気用ガスケットを利用する
- ③ 微好気培養のできる孵卵器 (37 ± 1℃、42 ± 1℃ (41.5 ± 1℃))
- ④ 寒天平板用乾燥器あるいはふらん器 (25 ~ 50℃)
- ⑤ pH メーター
- ⑥ 天秤
- ⑦ メスシリンダー
- ⑧ 除菌フィルター (0.22 μm)
- ⑨ ストマッカー、ストマッカー袋
- ⑩ 滅菌ハサミ、ピンセット
- ⑪ 試験管 (小、中)、試験管立て
- ⑫ 三角フラスコ
- ⑬ 滅菌シャーレ (直径 85~100mm)
- ⑭ 白金耳、パスツールピペット
- ⑮ 滅菌ピペット (1、2、10 ml)

⑩ 滅菌コンラージ棒（スプレッター）

4. 増菌培養法

4-1 検体の調製

検体 25 g をハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取する。ストマッカー袋に入れ、100 ml のプレストン増菌培地を加え、1 分間ストマッキング処理を行う。

ISO 10272-1:2006 で行う場合は、上記の増菌培地に代え、225 ml のボルトン培地を使用する。ボルトン培地は事前に温めておく。

4-2 増菌培養

（プレストン培地）

微好気条件下にて $42 \pm 1^\circ\text{C}$ にて 24 - 48 時間培養する。

（ボルトン培地）ISO 法

微好気条件下にて $37 \pm 1^\circ\text{C}$ にて 4 時間培養の後に、 $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ にて 24 - 44 時間培養する。

5. 微好気培養方法

下記の方法によって設定する。

微好気条件とは酸素 5%、二酸化炭素ガス 10%、チッ素 85% を基本とする。

微好気条件は下記の方法によって設定する。

- ① 培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータを使用する。
- ② 市販の微好気ジャーシステム（ガスキットシステムなど）を利用する。
- ③ 通気性のない材質の容器または袋を使用し、これに増菌培養液を直接入れた後、密閉し通常のインキュベータで培養する。（選択増菌にのみ適用）

6. 分離培養

分離培地に、24 時間後と 48 時間後の増菌培養液を画線塗抹し、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ （ISO 法は $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ）にて 24 - 48 時間微好気培養する。分離培地は mCCDA 培地およびバツラー培地を用いる

培養液は油層を出来る限り避けて採取し、分離培地に塗抹する。

7. 確認試験

7-1 コロニーの観察および採取

選択分離培地上に発育したカンピロバクター・ジェジュニ／コリを疑う集落を 1 平板につき 2 ～ 5 個釣菌し、非選択性寒天培地平板培地に塗抹、純培養を行う。 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間微好気培養する。

7-2 コロニーの同定準備

血液寒天培地およびこれと同等の糖の含有が少ない非選択培地に塗抹して 42±1℃ (ISO 法は 41.5±1℃) にて 24 - 48 時間培養。

7-3 鑑別同定

- ① グラム染色などによる菌形の確認：ラセン状（球状 [コッコイド] の場合もある）のグラム陰性かん菌
- ② カタラーゼ陽性
- ③ オキシダーゼ陽性
- ④ ラテックス凝集テスト（DrySpotTest など）で陽性
- ⑤ 必要に応じて TSI 培地などで生化学試験

菌種を決定する場合は、以下を追加して行う

- ① 馬尿酸塩加水分解試験（*C. jejuni* [+], *C. coli* [-]）
- ② インドキシル酢酸塩加水分解陽性（*C. jejuni* [+], *C. coli* [+]
- ③ PCR 法によるジェジュニ/コリの判別

8. 培地等の組成（組成は ST-4 案で確定）

8-1 プレストン(Preston)増菌培地

8-2 ボルトン(Bolton)増菌培地

8-3 mCCDA 培地

8-4 バツラー(Modified Butzler)培地