



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Campylobacter jejuniの卵黄での増殖と保存

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森重, 正幸, 金城, 俊夫, 源, 宣之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5462

Campylobacter jejuni の卵黄での増殖と保存

森重正幸・金城俊夫・源 宣之

獣医公衆衛生学研究室
(1984年7月31日受理)

Growth and Survival of *Campylobacter jejuni* in Yolk

Masayuki MORISHIGE, Toshio KINJO and Nobuyuki MINAMOTO

Laboratory of Veterinary Public Health

(Received July 31, 1984)

SUMMARY

Growth and survival of a *Campylobacter jejuni* strain in yolk were investigated. Yolks were separated aseptically from fresh hen's eggs. After being homogenized, 4.5 ml of the suspension was dispensed into tube (16×165mm) and used as a yolk medium.

C. jejuni could grow well in yolk even in aerobic atmosphere. In 48 hours at 37°C the cell counts of *C. jejuni* increased up to 10⁸/ml. If these cultured tubes were closed tightly with rubber stoppers and stored at 4°C, the cells could survive at least 100 days of storage.

The data indicated that egg yolk can be used as a growth and maintenance medium of *C. jejuni*. It was also confirmed that commercial Dorset egg medium can be used.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (49) : 247-251, 1984.

要 約

卵黄が *Campylobacter jejuni* の増殖用及び保存用培地として使用できるかどうかを検討した。市販卵から卵黄のみ取り出してホモゲナイザーで均質化した後、中試験管に4.5mlずつ分注したものを卵黄培地として使用した。*C. jejuni* は卵黄培地でよく増殖し、しかも好氣的培養条件下でも充分増殖することがわかった。さらにこれを密栓して4°Cに保存すれば100日間も生存した。このことから、卵黄培地は培養及び保存が煩雑でまた困難であった *C. jejuni* の増殖用及び保存用培地として容易に利用しうることがわかった。なお、市販のドルセットの卵黄培地が同様に使用可能なことを示した。

結 言

Campylobacter jejuni は、Skirrow¹⁾ によってその培養法が確立されて以来、ヒトの腸炎起炎菌としてにわかに注目された。わが国においても本菌はヒトの散発性下痢症あるいは腸炎の起炎菌として最も重要な位置を占めており、また食中毒の原因菌としても注目され、昭和57年度から新たに食中毒菌にも指定されている。

本菌は微好気性菌で、しかも栄養要求もきびしいことからその培養法がやや煩雑であり、またいろいろな環境要因によって比較的容易に死滅することから培養後常時使用する菌株の保存もむづかしい。これらが本菌研究の阻害要因の一つとなってきた。

私共はヒトカンピロバクター腸炎の疫学的研究の一環として鶏卵の本菌汚染の調査を行ったが、その過程で *C. jejuni* が卵黄でよく増殖し、しかも卵黄中で比較的長期間生残しうることを見出した²⁾。

そこで本研究では、卵黄が本菌の増殖及び保存用培地として使用しうるか否かを検討した。

その結果、卵黄をそのまま液体培地として使用し、好氣的条件下で培養することにより、従来の微好氣培養のための装置やガスを必要とせずに本菌の培養が可能で、それを密栓して4℃に保存すれば長期間生存することがわかった。以下得られた成績の概要を報告する。

実験材料及び方法

使用菌株：ヒト由来の *C. jejuni* HP1240 株（東京都衛生研究所伊藤武博士より分与）を使用した。

卵黄培地及び培養法：使用した卵黄培地は市販卵より無菌的に卵黄のみ取り出し、これをホモゲナイザーで均質化した後、中試験管（16×165mm）に4.5mlずつ分注したものである。一部市販のドルセットの卵黄培地（ニッスイ）も使用した。培養は Gaspak（BBL）または混合ガス（酸素5%、炭酸ガス10%、窒素85%）を用いた微好氣的条件下あるいは通常の好氣的条件下で、何れの場合も37℃で48時間行った。

卵黄培地での増殖試験：*C. jejuni* を予め Skirrow または Butzler の血液寒天培地に増殖させて、これを生理食塩水に浮遊し、その0.5mlを卵黄培地4.5mlに接種して上述の2つの条件下で培養した。培養開始時と48時間培養後にそれぞれ平板法による菌数計算を行った。なお、対照として同様に作成した卵白培地も使用した。

この他、生理食塩水に浮遊した菌液を10倍段階希釈し、各0.5mlを卵黄培地と、対照として生理食塩水に接種して好氣的条件下で培養し、増殖性を調べた。

卵黄培地での保存試験：卵黄培地と対照として生理食塩水に、菌数を同じくした10倍段階希釈列を作った。これらをゴム栓で密栓後4℃に保存し、以後経時的に0.05mlずつ取り出して培養し、*C. jejuni* の生存の有無を調べた。一方これとは別に、卵黄菌液の場合、菌接種後37℃48時間好氣的に培養してから前記同様密栓保存して生存性を調べた。また、市販のドルセットの卵黄培地に接種後37℃48時間微好氣的に培養し、その後密栓して4℃に保存し、同培地での生存性も検討した。

実験成績

C. jejuni の卵黄培地での増殖

卵黄培地と、対照として卵白培地にそれぞれ同数の菌を接種し、微好氣的及び好氣的条件下で37℃48時間培養した。その結果 Table 1 に示すように、卵黄培地では培養開始時の菌数 6.2×10^5 が培養後は微好氣的条件下では 1.1×10^9 と、また好氣的条件下でも 2.0×10^8 まで増殖し、卵黄が本菌の増殖を支持することが示された。

Table 1. Growth of *C. jejuni* in egg yolk and white

Medium	Cell counts/ml at the beginning	Cell counts/ml after cultivation*	
		Microaerobic atmosphere	Aerobic atmosphere
Yolk	6.2×10^5	1.1×10^9	2.0×10^8
White	6.2×10^5	6.0×10^2	$< 2.0 \times 10^2$

* Cultured at 37℃ for 48 hrs.

これに対し、卵白培地では培養することにより菌数が1/1,000あるいはそれ以下に減少し、全く増殖できないことがわかった。

また、Table 2 に示すように菌数未知の菌浮遊液を10倍段階希釈し、これらを卵黄培地と対照として生理食塩水に接種し、培養前後の菌の検出状況を比較してみると、卵黄培地では接種直後 10^{-6} レベルまで菌が検出できたのが、37℃48時間好氣的培養により 10^{-8} レベルまで菌が検出された。このことは直接培養の場合より1/100の菌数でも検出できることを意味しており、卵黄が増菌培地としても使用しうることを示唆している。これに対し、対照としての生理食塩水の場合、濃厚菌液でもこの培養条件下で完全に死滅している。

Table 2. Growth of C. jejuni in yolk

Medium	Time checked for bacterial growth	Dilution of C. jejuni suspension inoculated								
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Yolk	Beginning of cultivation	•	+	+	+	+	+	+	-	-
	After cultivation at 37°C for 48 hrs in air	•	•	•	•	+	+	+	+	+
Saline solution	Beginning of cultivation	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	After cultivation at 37°C for 48 hrs in air	-	-	-	-	-	-	-	-	-

• : Not tested

C. jejuni の卵黄培地での保存

C. jejuni が卵黄培地で増殖することが確認されたので、次に卵黄の本菌保存用培地としての使用の可能性を調べた。

菌数が8.0×10⁷/mlから8.0×10²/mlになるよう卵黄と対照として生理食塩水に10倍段階希釈列を作り、直ちに密栓して4℃に保存した。なお、菌数が8.0×10⁷~8.0×10⁵の3段階の卵黄については、保存前に37℃48時間好氣的条件下での培養も行ってみた。

得られた結果をTable 3に示したが、浮遊後直ちに保存した場合、表の左側のデータのよう、菌数が多い程長期間生存しうることがわかる。また卵黄と生理食塩水を比較すると、卵黄の方が約2倍生存期間が延びている。しかし卵黄の場合、一度37℃48時間増菌後、4℃に保存すると表の右側に示してあるように110日までの生存が確認され、生存期間が著しく延長した。

このようなことから、次に市販のドルセットの卵黄培地に増殖させた後保存性を調べてみたが、120日まで生存が確認され、本培地が保存培地として充分使用可能なことを立証しえた。

Table 3. Survival of C. jejuni in yolk at 4℃

Days of storage	Stored immediately after C. jejuni were suspended Cell counts 8.0×10 ^x /ml										Stored after inoculated yolks were cultivated* Cell counts 8.0×10 ^x /ml				
	X=7		6		5		4		3		2		X=7	6	5
	Y	S	Y	S	Y	S	Y	S	Y	S	Y	S	Y	Y	Y
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
19	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
30	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
40	+	-	+	•	+	•	•	•	•	•	•	•	+	+	+
62	-	•	-	•	-	•	•	•	•	•	•	•	+	+	+
71	-	•	-	•	-	•	•	•	•	•	•	•	+	+	+
81	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	+	+	+
90	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	+	+	+
100	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	+	+	+
110	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	+	+	+
120	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	-	-	-
135	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	-	-	-

*Cultured at 37°C for 48 hrs atmosphere. Y : Yolk ; S : Saline solution

考 察

私共は C. jejuni による鶏卵汚染の可能性を調査している過程で、鶏卵に実験的に接種された本菌の回収法について検討し、卵をそのまま37℃48時間培養した後分離培養を行った方が回収率が高まることを経

験した²⁾。すなわち卵黄に本菌に対する増菌効果のあることを確認した。

そこで本研究では、培養条件が面倒な *C. jejuni* の培養に卵黄が利用できないか否かを検討することにした。

C. jejuni は微好気性菌であるため、その培養には特殊な容器の他、Gas Pak や混合ガスを必要とするだけでなく、培養後の菌の保存も困難である。

今回の実験成績から、卵黄をホモゲナイザーで均質化したものをそのまま培地として使用するだけで、本菌が特に微好气的条件下で培養することなしに、充分増殖することが立証された。菌を段階希釈して接種した成績 (Table 2) から卵黄に増殖効果のあることが示されている。成績には示さなかったが、卵殻内の卵黄に菌を接種した場合10ヶ以下の菌数でも増菌後回収が可能で、卵黄が優れた培地であることが確認された。

卵黄には各種栄養素が含有されているだけでなく、菌に有害に働く培地中の因子を破壊することで菌の回収を高めることができるといわれている³⁾が、多分好气的条件下での酸素の本菌に及ぼす有害作用を制御しているものと思われる。

一方、比較の意味で行った卵白の場合は全く増殖がなく、逆に菌数が1/1,000以下に減少した。これは卵白に含まれるリゾチームやコナルブミンなど多くの抗菌物質に *C. jejuni* が高い感受性を示す結果であろう⁴⁾。

次に卵黄の *C. jejuni* の保存性について検討してみた。*C. jejuni* は生体外に排泄された場合、環境の温度、湿度、pH その他いろいろな要因の影響を受け比較的容易に死滅してしまう⁵⁻¹⁰⁾。このことは実験室内で日常使用する菌株の保存の面でも例外でなく、例えば血清あるいは血液寒天斜面では少なくとも1ヶ月に1度の割で頻繁に継代する必要がある。今回の実験成績から培養した菌を卵黄に浮遊して4℃に保存すれば生理食塩水に浮遊して保存した場合より2倍も長く生存可能であり、卵黄成分が *C. jejuni* を保護していることがわかった。しかしこの場合でも10⁷レベルの菌数で40日までしか生存しなかった。そこで保存前に一度好气的条件下で増殖させたところ、100日までの生存が確認された。これは増菌によって多分菌数が10⁹レベルまで増えた結果にも影響されるが、しかし Table 3 で菌数と保存日数との関連から推測できるように、菌数の増加だけで100日まで生存期間が延長したとは考えられない。これは培養することにより、卵黄成分が菌の保存にとって好都合なように修飾された結果によると思われる。

このように卵黄培地に菌を接種し、好気培養後4℃に保存すれば3ヶ月以上も保存が可能であることがわかった。

今回の実験では卵黄を均質化してそのまま培地として使用しているが、卵黄の濃度を変えた場合の試験も今後行う必要がある。市販のドルセットの卵黄培地(卵黄濃度80%)での保存試験の結果では120日まで生存を確認しているため、今後卵黄を他の培地とうまく組み合わせることによりさらに優れた増殖あるいは保存用培地を考案することも可能であろう。

なお、今回の実験では卵黄の質の面の検討を全く行っていない。鶏が高率に *C. jejuni* を保菌していることから^{2,11,12)}、*C. jejuni* に対する抗体の卵黄への移行も当然考慮する必要がある。市販の培地用の卵黄液(Oxoid)の使用で解決されることであるが、しかし現在まで市販卵の卵黄使用で特に支障はなかった。*C. jejuni* を好气的条件下で培養でき、しかも菌の保存にも適していることから、卵黄が今後 *C. jejuni* の増殖及び保存用培地として広く利用できるであろう。

なお、最近 Hänninen *et al.*¹³⁾が別の目的で液卵における *C. jejuni* の増殖と生存性について報告しているが、卵黄について今回の成績と同様な結果を得ている。

謝 辞

本実験に使用した *C. jejuni* の菌株を分与下さった東京都立衛生研究所の伊藤 武博士に感謝します。本研究の一部は昭和59年度文部省科学研究費一般研究C No.59560298 の補助によって行われた。記して謝意を表したい。

文 献

- 1) Skirrows, M. B. : Campylobacter enteritis : a "new" disease. Brit. Med. J. **2** : 9-11, 1977.
- 2) 森重正幸・金城俊夫・源 宣之 : *Campylobacter jejuni* の鶏卵汚染の可能性について. 食品と微生物 **1** : 114-118, 1984.
- 3) Baird-Parker, A. C. : The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after storage of frozen or dried cells. J. Appl. Bacteriol. **28** : 390-402, 1965.
- 4) Board, R. G. : Microbiology of the hen's egg. Adv. Appl. Microbiol. **11** : 245-281, 1969.
- 5) Christorher, F. M., Smith, G. C. & Vanderzant, C. : Effect of temperature and pH on the survival of *Campylobacter fetus*. J. Food Protect. **45** : 253-259, 1982.
- 6) Doyle, M. P. & Roman, D. J. : Growth and survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* as a function of temperature and pH. J. Food Protect. **44** : 596-601, 1981.
- 7) Doyle, M. B. & Roman, D. J. : Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to drying. J. Food Protect. **45** : 507-510, 1982.
- 8) 伊藤 武・斉藤香彦・高橋正樹・坂井千三 : Thermophilic campylobacter の発育態度および各種条件下における生存について. 日細菌誌 **38** : 337, 1983.
- 9) Svedhem, A., Kaijser, B. & Sjögren, S. : The occurrence of *Campylobacter jejuni* in fresh food and survival under different conditions. J. Hyg., **87** : 421-425, 1981.
- 10) Ware, D. A., Colley, P. J. & Park, R. W. A. : Oxygen requirement and sensitivity of *Campylobacter* spp. Proc. Soc. Microbiol. **5** : 19, 1977.
- 11) Kinde H., Genigeorgis, C. A. & Pappaioanou, M. : Prevalence of *Campylobacter jejuni* in chicken wings. Appl. Environ. Microbiol. **45** : 1116-1118, 1983.
- 12) Smeltzer, T. I. : Isolation of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses. Aust. Vet. J. **57** : 511-512, 1981.
- 13) Hänninen, M. L., Korkeala, H. & Pakkala, P. : Growth and survival characteristics of *Campylobacter jejuni* in liquid egg. J. Hyg., Camb. **92** : 53-58, 1984.