[原 著]

Helicobacter 属菌種迅速検出のための各種市販培地の性能評価

富田純子・菓子田充明・笈西一樹・遠藤隆一・森田雄二・河村好章 愛知学院大学薬学部微生物学講座

(平成 20 年 4 月 21 日受付,平成 20 年 8 月 1 日受理)

Helicobacter 属菌種を対象とした培地の性能評価はこれまで主に Helicobacter pylori により 行われてきたが,近年,Helicobacter cinaediの検出報告が散見されることから,H. cinaediを 含む多数の Helicobacter 属菌種を使い,各種市販培地の性能評価を行った。Helicobacter 属 15 菌種基準株とH. cinaedi 臨床分離株 14 株を用いて、日水製薬の羊血液寒天培地、ヘリコバク ター寒天培地,変法スキロー培地,変法スキロー EX 培地,栄研化学の HP 分離培地, Vi ヘリコ 寒天培地, 極東製薬のピロリ寒天培地, およびベクトンディッキンソンのコロンビア HP 寒天 培地の8種を比較した。8種の培地のうち、ヘリコバクター寒天培地、Vi ヘリコ寒天培地、ピロ リ寒天培地は、血清含有培地であり、さらに還元系色素が添加されているため、半透明な培地に 紫色のコロニーを形成し、血液寒天培地よりも目視により迅速に菌の発育が確認できた。この3 種の培地の中ではヘリコバクター寒天培地での発育が一番良好であった。発育菌の活性を評価 する目的で行った ATP 活性測定では、羊血液寒天培地および変法スキロー培地上に発育した 菌体の活性測定値が培養5日目に急激に低下するのに対し、ヘリコバクター寒天培地上の菌体 の ATP 活性は維持されていることが明らかになった。さらに細胞の形態観察を行うと、羊血液 寒天培地および変法スキロー培地上の菌体の多くが培養5日目には球菌形に変化しているのに 対し,ヘリコバクタ-寒天培地上の菌体は螺旋形態が保持されていた。以上の結果から,ヘリコ バクター寒天培地は迅速検出,発育支持力の両面において優れていると考えられた。

Key words: Helicobacter cinaedi, 選択培地, 迅速検出

序 文

Helicobacter 属は 2008 年 4 月現在 30 菌種に分類 されており、それらは大きく腸肝在位菌 (enterohepatic) と胃在位菌 (gastric) に分けられる。ヒトか ら分離される Helicobacter species としては、gastric Helicobacter species に含まれる Helicobacter pylori が有名であるが、enterohepatic Helicobacter species に分類される Helicobacter cinaedi, Helicobacter bilis, Helicobacter canadensis, Helicobacter canis, Helicobacter fennelliae, Helicobacter pullorum も知られて いる¹。なかでも H. cinaedi は 1980 年代以降、何らか

著者連絡先:(〒464-8650)名古屋市千種区楠元町1-100
 愛知学院大学薬学部微生物学講座
 河村好章
 TEL:052-757-6780
 FAX:052-757-6780
 E-mail: kawamura@dpc.agu.ac.jp

の基礎疾患により免疫機能が低下した患者の腸管や肝 臓,血液からの分離例が報告されている^{2,3)}。近年で は、免疫異常のない患者からの症例報告も見られる4)。 また、特定クローンの H. cinaedi が同一の病院内で蔓 延し,院内感染を引き起こした報告もある^{5,6)}。ヒト以 外にはイヌ、ハムスターなどの家畜からも分離報告が ある人畜共通感染症であると同時に,新興感染症とし て位置づけられている。このような背景から, H. cinaedi は臨床の現場において注意すべき菌種である が、本菌種を含む Helicobacter 属菌種は培養が困難な ものが多い。菌の発育は微好気環境で数日間を要し、 また、遊走性集落を形成するものが多く、平板には フィルム状 (thin spreading layer) に成育するため発 育の確認が困難である。そのため、臨床現場では Helicobacter 属菌種の迅速かつ確実な培養方法の確立が求 められている。

Helicobacter 属菌種を対象とした選択分離培地は, 現在数種が市販されているが,それら培地の性能評価

日本臨床微生物学雑誌 Vol. 18 No. 4 2008. 7

は主に H. pylori により行われてきた⁷⁾。しかし, H. pylori だけでなく H. cinaedi などの検出報告も散見さ れることから, H. pylori 以外の菌種による性能評価の 必要性を認識し, Helicobacter 属 15 菌種基準株およ び H. cinaedi 臨床分離株 14 株により市販培地 8 種の 性能を比較評価したので,その結果を報告する。

対象と方法

1. 使用培地

羊血液寒天培地(日水製薬)および Campylobacter spp. の分離培地として市販されている変法スキロー 培地(日水製薬),変法スキロー培地 EX(日水製薬), H. pyloriの分離用培地であるヘリコバクター寒天培 地(日水製薬),ポアメディア HP 分離培地(栄研化 学),ポアメディア Vi ヘリコ寒天培地(栄研化学),コ ロンビア HP 寒天培地(日本 BD),ピロリ寒天培地 (極東製薬)の8種の培地を比較した。

羊血液寒天培地,変法スキロー培地,変法スキロー 培地 EX,ポアメディア HP 分離培地,およびコロン ビア HP 寒天培地の 5 種は培地成分に血液を含有し ており,*Helicobacter* 属菌種は赤色培地上に半透明色 の集落を形成する。一方,ヘリコバクター寒天培地, ポアメディア Vi ヘリコ寒天培地,ピロリ寒天培地の 3 種はウマ血清を含有した半透明培地であり,発色試 薬 tetrazolium violet が添加されているため菌体の発 育に伴い細胞内脱水素酵素により還元され,紫色を呈 する。

2. 使用菌株

Helicobacter 属 15 南 種 基 準 株: H. bilis PAGU 599^T (=LMG 18386^T), H. canadensis PAGU 600^T (=CCUG 47163^T), H. canis PAGU 598^T (=NCTC 12379^T), *H. cinaedi* PAGU 597^T (=CCUG 18818^T), H. fennelliae PAGU 601^T (=CCUG 7546^T), H. pullorum PAGU 602^T (=NCTC 12824^T), Helicobacter anseris PAGU 940^T (=MIT 04-9362^T), Helicobacter brantae PAGU 941^T (=MIT 04-9366^T), Helicobacter marmotae PAGU 943^T (= MIT 98-6070^T), Helicobacter mastomyrinus PAGU 944^T (=MIT 97-5574^T), Helicobacter ganmani PAGU 603^T (=CCUG 43526^T), Helicobacter hepaticus PAGU 604^T (=LMG 16316^T), Helicobacter muridarum PAGU 606^T (=LMG 13646^T), Helicobacter pametensis PAGU 607^{T} (=LMG 12678^T), *Helicobacter acinonychis* PAGU 609^T (=LMG 12684^T) を用いた。

さらに, *H. cinaedi* の国内および国外の臨床分離株 14 株も使用した。

- 3. 種市販培地の性能評価
- a) 8 種市販培地の発育比較と培養条件の検討

培養法は①ガス置換チャンバー培養,②アネロパッ ク培養、③キャンピパウチ培養の3種を用いた。①ガ ス置換チャンバー培養は、容器内を脱気後、N₂80%、 CO₂10%、H₂10%の混合ガスで置換した(Fig. 1)。湿 らせたティッシュペーパーをチャンバー内に置いてお き、湿度を維持した。②アネロパック培養は、アネロ パックヘリコ微好気性菌・簡易培養用(三菱ガス化 学)と角型ジャー(三菱ガス化学)を使用し、①と同 様に湿度を維持して培養した。③キャンピパウチ培養 は、BBLキャンピパウチ微好気システム(BD)に付属 の液体を注入し、パウチを密閉して培養した。残念な がら現在このキャンピパウチは発売が中止されてい る。

ガス置換チャンバー培養法を用いて、8種の市販培 地に*Helicobacter* 属 15 菌種基準株および *H. cinaedi* 臨床分離株 14 株を 37 ℃、3 日間培養し、菌の発育状 況を目視観察により3 段階で評価した。また、アネロ パック培養法、キャンピパウチ培養法においては、ヒ トからの分離報告のある enterohepatic *Helicobacter* 6 菌種基準株を用いて、同様に評価した。



Fig. 1. Gas displacement chamber system. ① chamber (desiccator with valve), ② pressure gauge, ③ vacuum pump, ④ compressed gas cylinder ($N_2 80\% + CO_2$ $10\% + H_2 10\%$)

b) 色調変化による発育状況の比較

血液含有培地(赤色培地)と血清含有培地(半透明 培地)での増殖の様子の比較を行った。羊血液寒天培 地を対照とし、上述の「培地の性能評価」の結果、成 績が良好であった変法スキロー培地(血液含有培地) およびヘリコバクター寒天培地(血清含有培地)の3 種の培地を使用した。*Helicobacter*属菌種は発育条件 に高湿度を要するため、培養中に水分を十分維持でき るよう 200 µlの滅菌水を各試験培地に載せ、羊血液 寒天培地で前培養した *H. cinaedi* PAGU 597^T を各試 験培地に載せた滅菌水で懸濁し、そのまま薄く塗り広 げた。ガス置換チャンバーで 37℃、3 日間培養し、1 日ごとに発育状況を観察した。

c) ATP 活性測定による増殖菌の代謝活性測定

上述の発育試験で発育が良好であった、羊血液寒天 培地、変法スキロー培地、ヘリコバクター寒天培地の 3種の培地を使用した。前培養した H. cinaedi PAGU 597^T および新鮮な臨床分離株である PAGU 934 を使 い、ミューラーヒントンブロス (MHB) にて McF#1 の菌液を作製し、さらにその菌液を 10 倍希釈した。 各培地に希釈した菌液を 200 µl ずつ接種した。エー ゼで培地全体に塗り広げ、ガス置換チャンバーを用い て 37℃、微好気、湿潤状態で培養した。培養 1 日目、 3 日目、5 日目に各培地に生育した菌体の ATP 活性 を測定した。ATP 活性値は、各培地に MHB 3 ml を 載せてエーゼで菌体を浮遊させ、菌液をすべて回収し

Table 1. Growth level of each media using gas displacement chamber.

Species	PAGU No.		Non blood						
		① Blood agar	2 Skirrow	③ Skirrow Ex	④ HP selective	⑤ Columbia HP	[®] Helico- bacter	⑦Vi Helico	
H. bilis	599^{T}	++	++	++	++	++	++	W	++
H. canadensis	600^{T}	++	++	++	+	++	++	W	+
H. canis	598^{T}	++	++	++	++	++	++	W	+
H. cinaedi	597^{T}	++	++	++	++	++	++	+	++
H. fennelliae	601 ^T	++	++	++	++	++	++	+	++
H. pullorum	602^{T}	++	++	++	++	++	+	W	+
H. anseris	940 ^T	++	++	++	W	+	++	+	++
H. brantae	941 ^T	++	++	++	++	++	++	W	-
H. marmotae	943^{T}	++	++	++	++	++	++	W	++
H. mastomyrinus	944^{T}	++	++	++	-	+	++	+	-
H. ganmani	603^{T}	++	W	W	+	W	W	W	W
H. hepaticus	604^{T}	+	++	++	+	++	W	++	+
H. muridarum	606 ^T	++	+	++	W	W	—	_	-
H. pametensis	607^{T}	++	++	++	++	++	++	W	-
H. acinonychis	609 ^T	++	++	++	++	++	W	+	++
H. cinaedi	611	+	++	+	++	+	++	W	++
H. cinaedi	612	++	++	++	++	+	+	—	W
H. cinaedi	615	++	++	++	++	++	++	+	+
H. cinaedi	616	++	++	++	++	++	++	W	W
H. cinaedi	623	++	++	++	++	++	++	+	W
H. cinaedi	624	++	W	W	W	W	—	_	-
H. cinaedi	630	++	++	++	++	++	++	+	+
H. cinaedi	636	++	++	W	++	+	+	+	+
H. cinaedi	640	++	++	+	++	+	+	W	W
H. cinaedi	641	+	W	W	W	W	++	W	+
H. cinaedi	642	++	++	+	++	++	++	+	++
H. cinaedi	824	++	++	++	++	++	++	+	W
H. cinaedi	825	++	++	++	++	++	++	+	—
H. cinaedi	934	++	+	+	+	++	+	W	W

Growth level was evaluated in four stages. ++: good growth, +: middle growth, w: weak growth, and -: no growth.

た後, その 50 μ l を採り, Bac Titer-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega) 試薬 50 μ l と混合し, マルチモードディテクター (DTX 880. Backman Coulter) で化学発光強度を測定した。

同時に培養1日目,3日目,5日目に顕微鏡による 各培地での発育菌体の形態観察をグラム染色により 行った。 結 果

1. 8種市販培地の発育比較と培養条件の検討

3種の培養条件で3日間培養した後,生育した菌量 を比較した。8種の市販培地によるガス置換チャン バー培養での結果をTable 1, Fig. 2 に示す。また,ア ネロパックおよびキャンピパウチ培養の結果をTable 2 に示す。本研究で使用した3種の培養法の中ではガ ス置換チャンバーでの培養が最も発育良好であった。 羊血液寒天培地を除く7種の選択培地の中では,変法



Fig. 2. A summary of the growth level in eight media using gas displacement chamber. Number of strains evaluated by each growth level (++, +, w, -) was showed.

Species	PAGU No.	Gas system	Blood					Non blood		
			① Blood agar	2 Skirrow	③ Skirrow EX	④HP selective	⑤ Columbia HP	⁽⁶⁾ Helico- bacter	⑦Vi Helico	⑧Pylori agar
H. bilis	599^{T}	ANE	+	++	++	W	++	W	W	W
		CAM	++	+ +	+ +	W	++	W	W	W
H. canadensis	600^{T}	ANE	++	+	W	W	+	—	—	—
		CAM	+	W	W	W	+	+	W	W
H. canis	598^{T}	ANE	++	++	+	+	++	—	—	—
		CAM	+	+	+	+	+	—	—	—
H. cinaedi	597^{T}	ANE	++	++	++	++	++	++	+	+
		CAM	++	++	++	++	++	+	+	+
H. fennelliae	601^{T}	ANE	++	++	++	++	++	++	++	++
		CAM	++	++	++	++	++	+	+	+
H. pullorum	602^{T}	ANE	++	++	+	+	+	—	—	—
		CAM	+	+	+	+	+	W	—	—

Table 2. Growth level using Aneropack and Campypouch.

Each type strain of six species designated as an enterohepatic *Helicobacter* species was used. Growth level was evaluated in four stages, same as the legend in Table 1 (++, +, w, -). ANE: Aneropack, CAM: Campypouch.



Fig. 3. Comparison of the color change by the colony growth. Bacterial growth was observed at daily intervals for three days. *H. cinaedi* PAGU 597^T was incubated in a gas displacement chamber. Purple color depending on bacterial growth was easy to find on the Helicobacter agar from the first day.

スキロー培地での発育状態が最も良く,血液含有培地 のほうが全体的に菌量が多かった。血清を含有するへ リコバクター寒天培地,ポアメディア Vi ヘリコ寒天 培地,ピロリ寒天培地の3種の透明培地の中では,へ リコバクター寒天培地での発育が最も良好であった。

2. 色調変化による発育状況の比較

ヘリコバクター寒天培地は、羊血液寒天培地と変法 スキロー培地に比べて1日ごとに増殖していく様子 が明確に確認できた(Fig. 3)。ヘリコバクター寒天培 地には還元系発色色素が添加されているため、培地上 に細菌が生育すると透明培地上に紫色の集落を形成し た。これにより、ヘリコバクター寒天培地は短時間 (24時間)の培養で発育の確認が可能であった。また、 菌量の変化も観察しやすいという結果が得られた。

3. ATP 活性測定による増殖菌の代謝活性測定

羊血液寒天培地および変法スキロー培地に発育した 菌体でATP活性測定を行ったところ,培養3日目以 降急激に値が低下した。一方,ヘリコバクター寒天培 地での発育菌体の測定値は,基準株(PAGU597)は3 日目以降緩やかに低下し,臨床分離株(PAGU934)で は5日目までATP活性値は上昇した(Fig.4)。

ATP活性測定と同時に,顕微鏡で菌体を観察した ところ,羊血液寒天培地および変法スキロー培地上の 菌体は培養5日目にはほぼ球菌形 (coccoid form)に なっていたのに対し,ヘリコバクター寒天培地上の菌 体は5日間培養後も螺旋形を維持しているものが多 かった (Fig. 5)。



Fig. 4. Evaluation of bacterial activity using ATP assay system.
H. cinaedi PAGU 597^T or PAGU 934 (clinical isolate) was cultured on each medium for 5 days. Bacterial cells were collected from each medium, on day-1, -3, and -5, and measure the activity. Data were means of triplicate. The bacterial activity of the cells collected from Blood agar and Modified Skirrow agar after 5 days culture were dramatically decreased, whereas the cells from the Helicobacter agar were still increasing or slightly decreased. RLU: relative luminescence units.

.......: Blood agar, ----: Skirrow agar, ----: Helicobacter agar.

考 察

従来, 培地評価の実験はコロニー数や集落のサイズ を計測することで実施されることが多かった。しか し, Helicobacter 属菌種はシングルコロニーを形成し にくく, 発育した菌の CFU (Colony Forming Unit) により培地評価を行うのは困難である。そこで、本研 究では定量的なデータに基づいて評価を行うために ATP 活性を測定した。「菌数+菌の活性」の和として の ATP 活性量により、その培地での発育支持力の評 価を行った。羊血液寒天培地および変法スキロー培地 上の菌体は培養5日目になると代謝活性が低下し、多 くは球菌形に変化していた。一方、ヘリコバクター寒 天培地上の菌体は5日間培養後も代謝活性の低下率 が低く、さらに、菌体もらせん形を保持しているもの が多く見られた。H. pylori は生存が厳しい環境に置か れるとらせん形から球菌形に変化することが知られて いる。形態の変化には温度,湿度,ガス条件,薬剤, 培養日数などのさまざまな条件が関与しているが、球 菌形への形態変化は結果として "nonculturable state" への移行であり, "bacterial cell death" の兆候 であるという報告がある⁸⁾。H. cinaedi も同様の発育 特性があることが十分に考えられる。したがって継代 を行う際に、既に球菌形に変化している菌体を釣菌し

12 日本臨床微生物学雑誌 Vol. 18 No. 4 2008.

ても増殖してこない危険性があり、注意が必要であ る。このような観点から考えると、ヘリコバクター寒 天培地は長時間培養後もらせん形態が維持されてお り、他の培地よりも発育支持力が優れていると考えら れた。これは各種検査のために継代培養等を行う臨床 現場においては非常に有用であると思われる。また、 継代時の発育環境においては培地の水分量にも注意す べきである。Helicobacter 属菌種は培養に高湿度を必 要とし、培地の水分量が低いと菌体は発育しない。市 販培地を使用する際,包装袋を開封してから経過した 時間によって培地の乾燥程度が変化するため、同じ培 地を使用しても培養に成功する場合も失敗する場合も ある。この問題を未然に防ぐため、本研究では培養す る際に培地上に滅菌水を200 µl 載せてから菌体を接 種するという手法を用いた。これにより,十分な水分 量が確保され、継代時の発育状態も改善することがで きた。

本研究で使用した3種の培養法の中では、ガス置換 チャンバーによる培養が最も発育良好であるという結 果が得られた。ガス置換チャンバー培養では脱気後、 N₂80%、CO₂10%、H₂10%のガスで置換している。 一方でアネロパックおよびキャンピパウチはO₂を吸 収し CO₂を発生するシステムのため、アネロパック





The cells collected from the Helicobacter agar on the day-5 sustained the spiral form, however the majority cells from Blood agar and Modified Skirrow agar changed the form into coccoid shape.

では O_2 が 6~12%, CO_2 が 5~8%の状態になり, + + ンピパウチでは O_2 が 5~15%, CO_2 が 5~12% の状態になる。本研究でのガス置換チャンバー培養と 他の 2 種の培養法との相違点は水素ガスの存在であ る。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology に は「*H. pylori*, *H. mustelae*, *H. nemestrinae*, *H. acinomychis* は微好気環境であれば水素を要求しない」と 記述されているが, 一方「*H. cinaedi* では, 水素は発 育に必須あるいは発育を促進する」と記載されてい る⁹。また, 水素ガスの有無が *Helicobacter* 属菌種の 発育に関与するという報告¹⁰ もあり, 今回の結果はそ れらと一致した。本研究ではデシケーター, 圧力計, バキュームポンプ,およびガスボンベからなるガス置 換チャンバーシステムを利用したが、その他に BD や Oxoid などの嫌気ガスパックシステムをカタリスト なしで使用し、水素を含むガス条件を作成する方法が 報告されている¹¹⁾。*Helicobacter* 属菌種の培養の際に は、このような水素ガスを発生する培養システムの使 用が推奨される。

Helicobacter 属菌種は上述したようにシングルコロ ニーを形成しにくく,特徴的なフィルム状の集落を形 成することが多い。H. cinaedi 以外では H. bilis や H. canadensis などもフィルム状の発育が見られると記 載されている^{12,13}。実際,本研究で使用したヒトから

日本臨床微生物学雑誌 Vol. 18 No. 4 2008. 13

分離報告のある6菌種の中では唯一H. fennelliae が ムコイド状の集落を形成したが、他の5 菌種はすべて 薄いフィルム状の集落が見られた。フィルム状の集落 を観察する際、血液を含有した赤色の培地では菌量が 少ないと発育を見逃す可能性が考えられる。一方で, 血清を含有した半透明培地上では発育した菌体は紫色 を呈するため菌量が少なくても発育の判断が容易であ り、24時間の培養で菌体を確認できた。それゆえに、 臨床現場において Helicobacter 属菌種の検出を迅速 に判断する際は発色色素を含有しているヘリコバク ター培地, Vi ヘリコ寒天培地, ピロリ寒天培地が有用 であると思われる。これら3種の培地で発育比較を行 うと、ヘリコバクター寒天培地での発育が良好であり 明らかに差が見られた。Viへリコ寒天培地およびピ ロリ寒天培地には、肉ペプトンや子牛脳浸出液などの 動物の肉片や臓器細胞(破砕)由来の成分が含まれて いる。一方、ヘリコバクター寒天培地にはミルクや大 豆由来ペプトンが含まれているが動物破砕細胞由来成 分は含まれていない。動物破砕細胞由来成分は、各種 アミノ酸を豊富に含み発育支持力が優れていると考え られるが、多量に含まれるシステインなどの含硫アミ ノ酸からはチオール基(S-H基)などが生成しやす く,その誘導体が発育抑制物質として作用し,発育支 持能に差が見られたのではないかと推測している。し かしながら, Helicobacter 属菌種の発育支持能の詳細 については不明であり、今後の課題である。

以上の検討の結果から、ヘリコバクター寒天培地 (日水製薬)は*Helicobacter*属菌種の迅速検出および 発育支持力の両面において優れており、選択分離培地 として有用性が高いと結論した。

文 献

- Solnick, J. V., D. B. Schauer. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin. Microbiol. Rev. 14(1): 59–97.
- 2) Totten, P. A., F. C. Fennell, F. C. Tenover, et al. 1985. *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. J. Infect. Dis. 151: 131–139.

- Kiehlbauch, J. A., R. V. Tauxe, C. N. Baker, et al. 1994. *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulites in immunocompromised patients. Ann. Intern. Med. 121: 90–93.
- Vandamme, P., E. Falsen, J. De Ley, et al. 1990. Identification of *Campylobacter cinaedi* isolated from blood and feces of children and adult females. J. Clin. Microbiol. 28: 1016–1020.
- Kitamura, T., Y. Kawamura, T. Akaike, et al. 2007. *Helicobacter cinaedi* cellulites and bacteremia in immunocompetent host after orthopedic surgery. J. Clin. Microbiol. 45(1): 31–38.
- 6) Iwashita, H., S. Fujii, Y. Kawamura, et al. 2008. Identification of the antigenic protein of *Helicobacter cinaedi* and its immunogenicity in humans with *H. cinaedi* infections. Clin. Vaccine Immunol. 15(3): 513–521.
- 7) 山口 勝,沖村幸枝,勝山 努,他. 2000. Helicobacter pylori 迅速検出のための「ヘリコバク ター分離培地(日水製薬)」の評価. 臨床微生物迅 速診断研究会誌 11(1): 27-32.
- Kusters, J. G., M. M. Gerrits, C. M. Vandenbroucke-Grauls, et al. 1997. Coccoid form of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. Infect. Immun. 65(9): 3672–3679.
- 9) Garrity, G. M., J. A. Bell, T. Liburn. 2005. Family II. *Helicobacteraceae* fam. nov. *In* Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., and Garrity, G. M. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriol*ogy. 2nd ed. Vol. 2. New York, Springer-Verlag.
- 田中孝志,後藤美江子,高橋 孝,他. 2007.血 液培養からの Helicobacter cinaedi およびその類 縁菌の分離培養と簡便同定法に関する検討. 感染 症学雑誌 81: 700-706.
- 平井義一,下村裕史,小熊恵二,他. 2005. H. cinaedi, H. fenneliae, H. pullorum の性状と病原 性. 臨床と微生物 32: 175-180.
- 12) Fox, J. G., L. L. Yan, E. N. Mendes, et al. 1995. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. J. Clin. Microbiol. 33(2): 445–454.
- 13) Fox, J. G., C. C. Chien, F. G. Rodgers, et al. 2000. *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. J. Clin. Micobiol. 38(7): 2546–2549.

Evaluation of Various Media for Rapid Detection of Helicobacter spp.

Junko Tomida, Mitsuaki Kashida, Kazuki Oinishi, Ryuichi Endo, Yuji Morita, Yoshiaki Kawamura Department of Microbiology, Aichi-Gakuin University, School of Pharmacy

The evaluation of commercially available media for *Helicobacter* species has been carried out mainly by Helicobacter pylori strains. However the reports of Helicobacter cinaedi infection have been increasing, we decided to investigate the performance of various media for growing several Helicobacter species. We evaluated following 8 media with using the type strain of 15 species of the genus Helicobacter, and 14 clinical isolates of H. cinaedi; Sheep blood agar (Nissui), Modified Skirrow agar (Nissui), Modified Skirrow agar EX (Nissui), HP selective agar (Eiken), Columbia Helicobacter pylori agar (BD), Helicobacter agar (Nissui), Vi Helico agar (Eiken), and Pylori agar (Kyokuto). Because the latter three media were containing horse-serum and indicator-dye (tetrazolium salt), the bacterial growth was recognizable at a glance by the violet-blue color on the translucent media. Within these three media, Helicobacter spp. was the best-grown on the Helicobacter agar. To evaluate the total activity of the growing bacteria, ATP assay system was applied. The bacterial activities of the cells collected from Blood agar and Modified Skirrow agar after 5 days culture were dramatically decreased, whereas the cells from the Helicobacter agar were still increased or slightly decreased. In addition, the cells collected from the Helicobacter agar after 5 days culture sustained spiral form, while the majority cells from Blood agar and Modified Skirrow agar changed the form into coccoid shape. From these data, we finally concluded that Helicobacter agar (Nissui) was useful for rapid detection and also sustaining the bacterial activity.