

200200975A

厚生科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

食品製造の高度衛生管理に関する研究

平成 14 年度総括研究報告書

主任研究者 品川邦汎

平成 15 年 7 月

I. 総括研究報告書

食品製造の高度衛生管理に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II. 分担研究報告書

II-1.

食鳥肉のカンピロバクターの定量的危害評価と処理工程でのコントロール方法

II-1-1. 国産および輸入鶏肉のカンピロバクターの汚染率・汚染菌数の比較に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-1-2. 鶏肉の保存温度と汚染細菌の増殖性ならびにカンピロバクターの生残性に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-1-3. カンピロバクターの保菌と腸管破損によると体への影響に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-1-4. パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法による Penner B 群 *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-1-5. *Campylobacter jejuni* Penner B 群分離株のパルスフィールド電気泳動 (PFGE) による遺伝子型の解析

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-2.

脱脂粉乳製造における食中毒菌（黄色ブドウ球菌等）およびブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌嘔吐毒の危害評価とその製造管理法の確立

II-2-1. 脱脂粉乳製造の高度衛生管理に関する研究—製造各工程における菌の挙動、エンテロトキシン産生条件等に関するデータ収集

高谷 幸（(社) 日本乳業協会）

II-3.

液卵（未殺菌液卵）製造におけるサルモネラ（特に *S. Enteritidis*）の危害評価と製造管理方法

II-3-1. 中小規模の液卵工場における HACCP マニュアル作製に向けて (1) 中小規模の液卵工場の製造工程・作業ラインおよび実際の作業現状について

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-2. 中小規模の液卵工場における HACCP マニュアル作製に向けて (2) 手割液卵工場内での衛生に必要な科学的データについて

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-3. 液卵・鶏卵に関連する食中毒発生や液卵の生産の現状について (1) 液卵による最近 5 年間（平成 9-13 年度）の食中毒事例の解析

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-4. 液卵・鶏卵に関連する食中毒発生や液卵の生産の現状について (2) 液卵の製造・流通の現状と細菌学的データについて

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-5. 液卵・鶏卵に関連する食中毒発生や液卵の生産の現状について (3) 液卵工場内でのモニタリングによる製造工程の問題点の明瞭化とその改善について

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-6. サルモネラに関する研究 (1) 1971 年以降のサルモネラ食中毒の原因と菌株の解析

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-7. サルモネラに関する研究 (2) *Salmonella Enteritidis* の生残性に及ぼす相対湿度の影響

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3-8. サルモネラに関する研究 (3) 鶏卵および採卵廃鶏におけるサルモネラ属菌汚染状況

高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

II-4.

と畜場での生食用牛肝臓処理における食中毒菌（カンピロバクター）の評価とその処理方法の検討

II-4-1. 牛肝臓生産におけるカンピロバクター衛生管理に関する研究（1）牛の肝臓等における *Campylobacter* 属菌汚染状況に関する研究

杓木力晴 （大阪市食肉衛生検査所）

II-4-2. 牛肝臓生産におけるカンピロバクター衛生管理に関する研究（2）牛肝臓の衛生的処理方法に関する研究

杓木力晴 （大阪市食肉衛生検査所）

平成 14 年度厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

総括研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

食品製造の高度衛生管理に関する研究

近年食中毒発生頻度が増加している原因食品、あるいは危害の発生した場合、社会的影響が極めて高い食品を選定し、これらの食品で特に危害性が高いと考えられる病原微生物を対象として広汎な文献収集を行い、微生物制御に有用な情報をデータベースとしてまとめた。このデータベースを食品製造従事者が利用しやすいように CD-ROM にまとめ、さらに CD-ROM のユーザーインターフェースを改善した。

また、選定した食品製造における病原微生物の制御方法を実験的に検討した。対象食品と対象病原微生物は次の通りである。

1. 食鳥肉のカンピロバクターの定量的危害評価と処理工程でのコントロール方法
2. 脱脂粉乳製造における食中毒菌（黄色ブドウ球菌）およびブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌嘔吐毒の危害評価とその製造管理法の確立
3. 液卵（未殺菌液卵）製造におけるサルモネラ（特に *S. Enteritidis*）の危害評価と製造管理方法
4. と畜場での生食用牛肝臓処理における食中毒菌（カンピロバクター）の評価とその処理方法の検討。

これらの食品を対象に、それぞれの食品に対する危害評価を行い、さらに各製造工程における危害分析を行い、そのコントロール手法を確立することを目的として調査研究を行った。

分担研究者

高谷 幸 日本乳業協会

高鳥浩介 国立医薬品食品衛生研究所

杓木力晴 大阪市食肉衛生検査所

合、社会的影響が極めて高い食品を対象に、それぞれの食品にしてその製造工程における危害の低減化のためのコントロール手法を確立することを目的として進めている。その中で、特に急務とされている対象食品および対象病原微生物（食中毒菌）として、以下に示す 4 種類の食品を対象に研究を行った。

1) 研究目的

食品の安全性確保は、その食品について十分なリスクアセスメントを行い、その成果を基にして製造段階でのリスクコントロールに応用することが基本である。食品製造における危害としては、生物学的、化学的および物理的危険が知られているが、この中で生物学的（微生物学的）危険の発生頻度は高く、コントロール手段を確立することが重要である。

本研究は、近年食中毒発生頻度が増加している食品、あるいは危害の発生した場

1. 食鳥肉のカンピロバクターの定量的危害評価と処理工程でのコントロール方法
2. 脱脂粉乳製造における食中毒菌（黄色ブドウ球菌）およびブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌嘔吐毒の危害評価とその製造管理法の確立
3. 液卵（未殺菌液卵）製造におけるサルモネラ（特に *S. Enteritidis*）の危害評価と製造管理方法
4. と畜場での生食用牛肝臓処理における

食中毒菌（カンピロバクター）の評価とその処理方法の検討。

2) 研究方法

平成 13 年度の本研究事業では、これらの食品と病原微生物を対象に危険度評価・コントロールを行うため、それぞれについての文献を収集し、整理を行った。平成 14 年度は引き続いてこのデータを広く活用できるようにデータベース化して CD-ROM の作成を行った。また、文献学的調査で明らかになった問題点に対し、食品製造の工程において定量的危害評価を行い、さらに危害の発生予防対策として病原菌（食中毒菌）コントロール手法について検討した。

3) 結果と考察

1. 食鳥肉のカンピロバクターの定量的危害評価と処理工程でのコントロール方法

1-1) 食鳥肉のカンピロバクター汚染、増殖性、生残性および制御法等に関する文献収集、整理を行い、食鳥生産段階から販売店までの食鳥肉の製造段階ごとに区別して、それぞれデータを集計して CD-ROM を作成し、広く活用できるようにした。

1-2) 国産および輸入鶏肉におけるカンピロバクター (*C. jejuni/coli*) の汚染状況の比較

輸入鶏肉のカンピロバクター汚染を定量的に解析し、国産品との比較を行った。小売店（計 4 店舗）において国産鶏肉 50 検体および輸入鶏肉 100 検体を購入し、鶏肉中のカンピロバクターの汚染菌数を調査した。輸入鶏肉は国産鶏肉に比べ汚染率も低く、汚染菌数も少ない傾向が認められた。さらに、鶏から最も多く分離された *C. jejuni* 血清型の Penner B 群の菌株について、患者由来の菌株を PFGE 法により型別を行い、本腸炎（食中毒）を起こす菌の遺伝子レベルでの検討も進

めている。

1-3) 鶏肉におけるカンピロバクターの増殖性および生残性に影響をおよぼす保存温度と汚染細菌叢との関連性

食鳥処理場でカット、包装された各鶏肉の細菌汚染状況と、カンピロバクターの増殖性・生残性について調べた。低温細菌数は 0°C の保存であっても、12 日後では保存開始時の 10^2 倍近くまで増殖した。また、分離されたカンピロバクターは、*C. jejuni* が優勢であった。カンピロバクターは増殖を示さず、保存日数の経過とともに菌数は低下し、分離率も減少した。しかし、鶏肉の消費期限内では本菌は生存しており、食鳥処理場での衛生対策と販売店における汚染拡大防止が必要であることが明らかとなった。

1-4) ブロイラーの処理工程におけるカンピロバクター汚染動態

食鳥処理工程におけると体のカンピロバクター汚染の動態を調べた。同一個体の脱羽後、中抜き後、冷却後のと体、包装前のムネ肉、モモ肉を対象に定量的にカンピロバクター汚染を調べたところ、中抜き工程でと体の菌数は明らかに高くなり、それ以降の工程では汚染菌数は減少が見られるが、製品まで残存・移行することが明らかになった。

1-5) 2 剤混合タイプの二酸化塩素による鶏肉中の *C. jejuni* 殺菌効果

食鳥処理場で、と体冷却に用いるチラー水に次亜塩素酸ナトリウムを添加しているが、その殺菌効果は十分ではない。今回、2 つの薬剤を混合して二酸化塩素を生成するタイプの薬剤の殺菌効果を検討した。次亜塩素酸ナトリウム水溶液と二酸化塩素水溶液の除菌効果は、対照の蒸留水浸漬と同程度であったが、2 剤混合型の二酸化塩素水溶液では対照に比べ 1/10 程度まで菌数が減少することが認められた。

2) 脱脂粉乳製造における食中毒菌（黄色

ブドウ球菌) およびブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌嘔吐毒の危害評価とその製造管理法の確立

2-1) 脱脂粉乳製造における農場での生乳から集乳センター(コールドセンター)、プラント(乳処理場)および脱脂粉乳の食品への応用等、における黄色ブドウ球菌、セレウス菌の汚染、生残性、増殖性およびブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌嘔吐毒産生性に関する文献を収集、整理し、これらのデータを CD-ROM に整理して広く活用できるようにした。

2-2) 濃縮乳における食中毒菌および毒素の危害分析とコントロール手法の確立

脱脂粉乳製造工程の濃縮乳について、実験的に微生物危害を解析し、HACCP構築における管理項目および管理基準設定のための基礎データを収集した。ブドウ球菌コアグラゼ型による増殖特性と毒素産生性を解析し、さらにこれらのブドウ球菌を濃縮乳(固形濃度:30, 40, 45, 50%)に接種して、種々の条件下(温度、時間、および溶存酸素量)における増殖特性および毒素産生性に対する影響の解析中を行っている。

2-3) 生乳中での黄色ブドウ球菌動態とエンテロトキシン産生性

生乳中での黄色ブドウ球菌の増殖性およびエンテロトキシン産生について、平成13年度より検討しているが、今回は10°C~20°Cの温度帯について検討した。その結果、他の温度帯と同様に生乳では黄色ブドウ球菌の増殖抑制の傾向が認められた。特に、10°Cでは牛乳(製品)中でブドウ球菌は漸増したが、生乳中では増殖を示さなかった。さらに、生乳より黄色ブドウ球菌を分離し、その生育温度およびエンテロトキシン産生性を検討した。分離菌34株は全て10°C以下では生育せず、48°Cでは17株が生育した。ほとんどの菌株はエンテロトキシン(SEA~SED)非産生であったが、1

株がSEA、もう1株がSEB産生性を示した。

3. 液卵(未殺菌液卵)製造におけるサルモネラ(特に*S. Enteritidis*)の危害評価と製造管理方法

3-1) 液卵における食中毒菌、特にサルモネラ(*S. Enteritidis*)に関する文献収集、整理を行い、これらの情報をまとめたCD-ROMを作成して広く活用できるようにした。さらに、以下の研究を行った。

3-2) 中小規模の液卵工場におけるHACCPマニュアル作成

液卵工場を見学し、情報収集を行って中小規模の液卵工場での問題点を浮き彫りにしてその回避方法を提案した(ラインのクロス、ストレーナーの交換、ひび割れ卵、B級破卵等)。さらに液卵工場のデータを元にマニュアル作成に必要な科学的データを列挙・整理した。次年度においては、今年度の調査で不足する部分のデータを収集・解析する予定である。

3-3) 液卵の現状把握とその対策

鶏卵を原因としたサルモネラ食中毒の近年の事例(1997年以降の2981事例、厚生労働省より入手)について、特に液卵を原因とする事例について衛生管理のための資料作成を目的として解析した。その結果、液卵の中では未殺菌液卵よるものが多く見られることが判明した。さらに液卵に関してその流通量や細菌数等を明らかにするため、液卵公社、各自治体が保有する液卵微生物検査データを収集、解析している。

3-4) サルモネラ食中毒防止のための基礎的研究

食品および患者より分離された*S. Enteritidis*について、1980年代前半と1989年以降に区別して、それぞれの菌株の特性を明らかにするために、phage type、侵入遺伝子等の解析を行っている。さらに、卵に移行する*S. Enteritidis*についても生化学性状を解析し、侵入性等の病原

性についても検討している。また、液卵工場の HACCP を行う上で液卵の原料である殻付卵が *S. Enteritidis* 非汚染であることが重要であることから、産卵鶏農場の GAP (適正製造基準) 導入に向けての取り組みにも着手している。さらに、液卵工場内や液卵を用いた食品加工工場での作業を考慮した条件を元にモデルを作成し、加熱や乾燥の *S. Enteritidis* への影響、生残性を検討している。

4. と畜場での生食用牛肝臓摘出における食中毒菌 (カンピロバクター、サルモネラ) の評価とその処理方法

平成 14 年度は、国内 9 箇所のと畜場 (青森県、新潟県、群馬県、埼玉県、東京都、神奈川県、大阪市、鳥取県、宮崎県) で解体されたウシの胆のう内胆汁、胆管内胆汁様液、肝臓 (尾状葉、方形葉、左様) について、カンピロバクターの定性的および定量的 (MPN 法および平板法の併用による) 汚染実態調査を行った。その結果、胆のう内胆汁は一定の頻度でカンピロバクターにより汚染されており、その菌数も $10^2 \sim 10^8$ レベルであることが明らかになった。汚染頻度に地域差は認められず、牛の品種 (乳牛、肉牛、F1) による差も認められなかった。また、これら胆汁中にカンピロバクター汚染が見られた個体の中には、肝臓もカンピロバクターにより汚染されているものが存在した。肝臓の汚染は、表面のみならず肝臓実質内にも見られ、腸管内容物中のカンピロバクターが上行性に胆管、胆のう、肝臓を汚染している可能性が推測された。肝臓の部位別 (尾状葉、方形葉、左様) の汚染頻度と汚染菌数に差は見られなかった。さらに、カンピロバクター陽性となった肝臓には、と畜検査により廃棄されたもののみならず、健康と診断されたものも高率に含まれていた。安全な生食用レバーを供給する上で、牛肝臓中のカン

ピロバクターの病原性とヒト疾病の関与を明らかにする必要性が示唆された。さらに、このようなカンピロバクターによる肝臓汚染をいかに排除し、また二次的な汚染を防ぐ方策を検討する必要があることから、牛解体工程のうち、肝臓を摘出するラインの拭き取り検査による汚染実態調査と、効果的な消毒剤の使用法について検討を始めている。

4) 結論

本研究では、近年食中毒発生頻度が増加している食品、あるいは危害の発生した場合、社会的影響が極めて高い食品と病原微生物を対象に危険度評価・コントロールを行うため、それぞれについての文献を収集・整理し、このデータを広く活用できるようにデータベース化して CD-ROM の作成を行った。さらに、各食品の製造工程における各病原微生物の汚染動態とその制御法を検討した。これらの成果は、食品製造の高度安全管理を達成するうえで、有用な知見になると考えられる。

II 分担研究報告書

II-1.

食鳥肉のカンピロバクターの定量的危害評価と処理工程でのコントロール方法

II-1-1. 国産および輸入鶏肉のカンピロバクターの汚染率・汚染菌数の比較に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-1-2. 鶏肉の保存温度と汚染細菌の増殖性ならびにカンピロバクターの生残性に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-1-3. カンピロバクターの保菌と腸管破損によると体への影響に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-1-4. パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法による Penner B 群 *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別に関する研究

品川邦汎（岩手大学農学部）

II-1-5. *Campylobacter jejuni* Penner B 群分離株のパルスフィールド電気泳動 (PFGE) による遺伝子型の解析

品川邦汎（岩手大学農学部）

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

国産および輸入鶏肉のカンピロバクターの
汚染率・汚染菌数の比較に関する研究

市販鶏肉を国産品と輸入品とに分けて調査したところ、国産鶏肉の 96.0% (48/50)、および輸入鶏肉の 16.0%(16/100)からカンピロバクターが分離された。分離されたカンピロバクターは国産鶏肉ではすべて *C. jejuni* (48/48) であったのに対し、輸入鶏肉では *C. jejuni* が 62.5% (10/16)、*C. coli* が 37.5% (6/16) であった。

さらに、MPN 法による定量検査で鶏肉のカンピロバクター菌数を比較したところ、国産鶏肉では 10^2 cfu/100g 以上の汚染が 80.0%(40/50)であったのに対し、輸入鶏肉ではわずか 2.0%(2/100)であった。

小野一晃 埼玉県衛生研究所
重茂克彦 岩手大学

国産品と輸入品とを比較したデータはない。

そこで、市販の国産および輸入鶏肉について、MPN 法によりカンピロバクターを定量的に検査し、汚染菌数の比較を行った。

A. 研究目的

近年、わが国におけるカンピロバクター食中毒は、欧米諸国同様、増加傾向にある。鶏肉は牛肉や豚肉に比べカンピロバクターの汚染率が高く、生または調理不十分な鶏肉の摂取による集団発生例が多数報告されていることから、カンピロバクター腸炎の原因食品として特に重視されている。鶏肉のカンピロバクターに対するリスク評価には、定性的試験(汚染の有無)のみならず、定量的試験により汚染菌数を把握することが必要である。われわれは平成 12 年度の本研究において、国産鶏肉のカンピロバクターの調査を行ったが、小売店で市販されている鶏肉の汚染率・汚染菌数の違いについて、

B. 検査方法

1) 検査材料

平成 12 年 3 月から平成 14 年 4 月にかけて、さいたま市内の小売店 (2ヶ所) から購入した国産鶏肉 50 検体および平成 11 年 8 月から平成 14 年 8 月にかけて、県内の卸売り市場 (2ヶ所) で購入した輸入鶏肉 100 検体 (ブラジル産 72 検体、アメリカ産 12 検体、中国産 9 検体、タイ産 7 検体)、計 150 検体を用いた。

2) カンピロバクターの定量検査

図 1 に検査法について示す。MPN (3 管) 法により鶏肉中のカンピロバクターの菌数を測定し、この際、検体と培地の割合は 1 : 4 で実施した。すなわち検体 25g に 100ml の Preston 培地 (ニュートリエントブイオン No.2 にプレストンカンピロバクター選択サプリメントとカンピロバクター発育サプリメントを添加し、5% 量の馬脱繊維血液を加えた) を加え、約 1 分間ストマッカー処理を行い、5 倍乳剤を作製した。この乳剤を 3 本の (空の) 試験管にそれぞれ 10ml ずつ分注し、さらに、乳剤の 1ml および 0.1ml を、10ml の Preston 培地の入った試験管 3 本ずつに接種し、42°C、24 時間微好気培養 (O_2 : 5%, CO_2 : 10%, N_2 : 85%) 後、各々 1 白金耳を CCDA 培地 (CCDA サプリメント添加カンピロバクター血液無添加選択カンテン培地) に塗抹し、42°C、48 時間微好気培養した。培地上の疑わしい集落を同定し、各段階希釈における試験管の陽性本数を最確数表に当てはめ、最終的には得られた結果を 5 倍して 100g 当たりの MPN 値を求めた。また、1 検体当たり 1 集落について、常法に基づきカンピロバクターの種の同定を行った。

C. 研究結果

表 1 に国産および輸入鶏肉からのカンピロバクターの分離状況を示す。カンピロバクターは国産鶏肉の 96.0% (48/50) から分離され、すべて *C. jejuni* であった。一方、輸入鶏肉は 16.0% (16/100) から菌が分離され、*C. jejuni* が 10.0% (10/100) *C. coli* が

6.0% (6/100) であった。国別の菌分離率は、ブラジル産 18.1%(13/72)、アメリカ産 0%(0/12)、中国産 0%(0/9)、タイ産 42.9%(3/7) であった。

また、表 2 に MPN 法によるカンピロバクターの定量検査の結果を示す。国産鶏肉は、陽性検体の 16.7% (8/48) が 10^1 台 (cfu/100g)、39.6% (19/48) が 10^2 台 (cfu/100g)、37.5% (18/48) が 10^3 台 (cfu/100g) の汚染であった。さらに、6.3% (3/48) が 5.5×10^3 cfu/100g 以上の汚染であった。

一方、輸入鶏肉は陽性検体の 87.5% (14/16) が 10^1 台 (cfu/100g) であり、ブラジル産とタイ産のそれぞれ 1 検体、12.5% (2/16) は 10^2 台 (cfu/100g) の汚染であった。

D. 考察

食品中の汚染菌数測定法として MPN 法があるが、通常、検体と培地の割合は 1 : 9 で用いられる。以前われわれが市販鶏肉について定性的に検査した際、検体 10g に増菌培地 90ml を加えて実施したが、カンピロバクターの分離率は国産鶏肉の 45.8% (33/72) に対し、輸入鶏肉は 3.7% (2/54) と低い値であった。輸入鶏肉の多くは約 -20°C の凍結状態で流通されており、食品中のカンピロバクターの菌数は凍結により減少することが報告されていることから、1 検体当たりの検体量を 10g から 25g に増やして定量検査を行った。今回、検体と培地の割合は 1 : 4 で用いたが、本法は、われわれが平成 13 年度に本研究で行った鶏レバーのカンピロバクターの菌数測定

において、直接平板塗抹法による測定値とよく一致し、菌数の把握に有効であった。今回、鶏肉を対象として検査したところ、国産鶏肉の方が輸入鶏肉よりも汚染菌数が高いことが明らかとなった。

国産鶏肉の汚染菌数は MPN 法で 94.0% (47/50) が 10^3 cfu/100g 以下であり、われわれが平成 12 年度に行った本研究結果や過去の報告例とも一致した。これに対し、国産鶏レバーの汚染菌数は 100g 当たりに換算すると同法により 58.9% (33/56) が 10^4 cfu/100g 以上であったことから、鶏肉の汚染菌数は鶏レバーよりも低いことがわかった。

また、今回調査した国産鶏肉の 6.0% (3/50) は、MPN 法の 3 段階希釈で 10ml(3/3)、1ml(3/3)、0.1ml(3/3)すべてが陽性で、その MPN 値は 5.5×10^3 cfu/100g 以上となり、正確な菌数を得ることができなかった。これら菌数の高い検体を定量的に検査するためには、試料の希釈段階をさらに増やす必要がある。しかし、MPN 法は作業が煩雑なことから、直接平板塗抹法との併用が有効であると考えられる。

一方、市販されている輸入鶏肉の汚染原因としては、「原産国内での汚染と」日本国内で小分け、あるいはパック詰めする際の汚染の 2 つが主な原因として挙げられる。今回の調査では、卸売り市場で 2kg 入りの大きな袋詰めのものを購入し、1 袋を 1 検体として用いたが、これらは日本国内では未開封であることから、原産国内での汚染実態を反映していると考えられる。また、供試した検体数は少ないが、タイ産鶏肉の菌分離率

が 42.9%(3/7)であったのに対し、アメリカ産 (12 検体) および中国産 (9 検体) の鶏肉からは菌が分離されなかったことから、今後検体数を増やして調査し、原産国の違いによる菌分離率・汚染菌数の差について検討する必要があると考えられる。

輸入品は国産品に比べカンピロバクターの分離率・汚染菌数とも低かったが、原産国における肉の汚染そのものが少なかったのか、それとも凍結状態で流通された結果、菌数が少なくなったのかについては明らかではない。鶏肉はシェルフライフが短く、魚介類と同様に高い鮮度が要求されることから、国産鶏肉の多くは食鳥処理場で処理された後、冷蔵状態で流通され、比較的短時間で消費者の手にわたる。一方、輸入鶏肉の多くは冷凍状態で流通されていることから、流通形態の違いによる菌数の動向について、さらに検討する必要があると考えられる。

図1 カンピロバクターの定量検査法

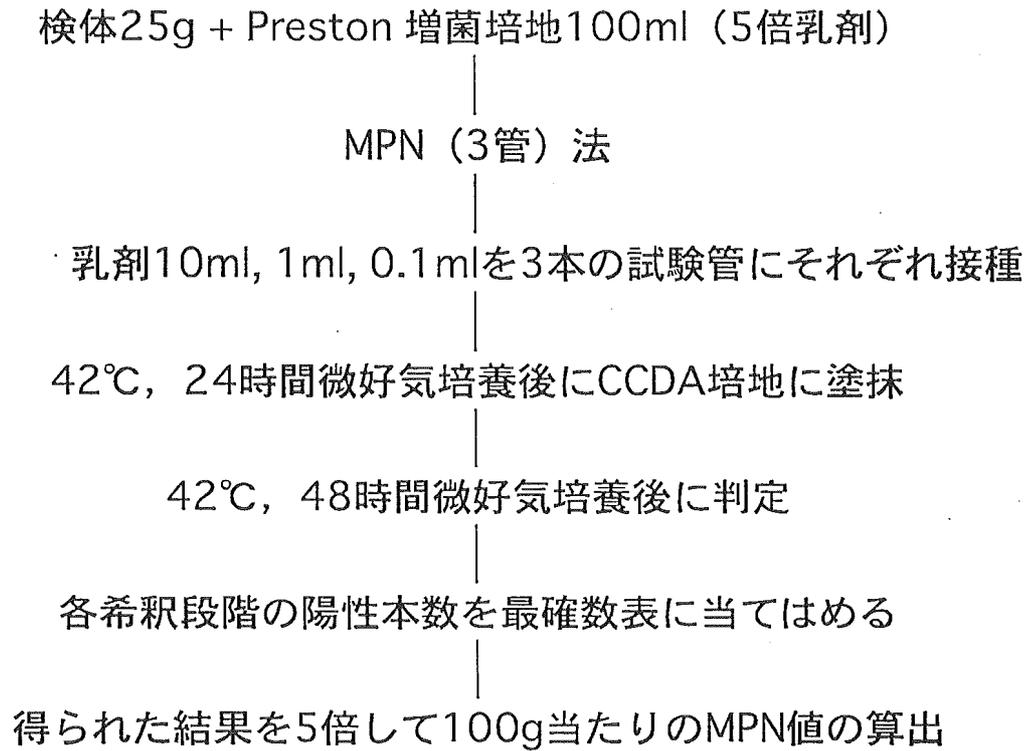


表1 各産地の鶏肉からのカンピロバクター検出状況

産地	検査検体数	陽性検体数 (%)
日本	50	48 (96.0)
ブラジル	72	13 (18.1)
アメリカ	12	0 (0.0)
中国	9	0 (0.0)
タイ	7	3 (42.9)

表2 MPN法による市販鶏肉のカンピロバクターの菌数別検体数

試料 (検体数)	菌数 (cfu/100g)			
	10 ¹ 台	10 ² 台	10 ³ 台	>5.5×10 ³
国産鶏肉(50)	2	8	19	18
輸入鶏肉(100)	84	14	2	0

¹⁾ 3管法によるMPNで10ml (0/3)、1ml (0/3)、0.1ml (0/3)と判定された検体数 (MPN値 : <15 cfu/100g)

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

鶏肉の保存温度と汚染細菌の増殖性ならびにカンピロバクターの生残性に関する研究

食鳥処理場でカット、包装された鶏肉の細菌汚染の状況を夏季と冬季あるいは午前と午後に処理されたものについて調査するとともに、肉の保存温度（0℃と4℃）と汚染細菌の増殖の関係、病原細菌であるカンピロバクターの生残性について調べた。胸肉を0℃で保存した場合、一般生菌数および大腸菌群数は、観察した12日間ほとんど変化は見られなかったが、4℃で保存した場合、12日後の両者の菌数は保存開始時の100～10000倍まで増殖した。包装時点において、一般生菌数には季節的変動が見られなかったが、大腸菌群数は冬季よりも夏季に増加傾向を示した。一方低温細菌数は季節的な変動は認められず、0℃の保存であっても、12日後の菌数は保存開始時の100倍近くまで増殖した。分離された低温細菌の優勢菌種は *Pseudomonas* 属菌で、保存開始時に優勢であった菌種が保存期間を通して優勢だった。午前と午後の処理では、いずれの汚染指標細菌数にも差は認められなかった。分離されたカンピロバクターは、*C. jejuni* と *C. coli* で、*C. jejuni* が優勢菌種であった。0℃、4℃保存とともにカンピロバクターは分離されたが、保存日数の経過とともに分離率は低下する傾向を示した。以上の結果から、鶏肉の鮮度を左右する汚染細菌は、包装時の汚染レベルと保存温度に大きく影響されることが判った。特に低温細菌の汚染と流通過程における温度管理が鮮度保持に影響する大きな要因となることが示唆された。カンピロバクターの分離率は保存日数の経過とともに低下したが、鶏肉の消費期限内には生存していると考えられ、食鳥処理場での衛生対策と販売店における汚染拡大防止が必要である。

協力研究者

三澤尚明 宮崎大学農学部

に着目し、肉の保存温度と低温細菌の増殖性とカンピロバクターの分離率や生残性への影響について調べた。

A. 研究目的

カンピロバクターは微好気性菌で、30℃以下の温度では増殖できないため、低温保存食品中では増殖できない。一方、低温保存鶏肉では、処理工程で汚染を受けた低温細菌等が増殖し、肉の鮮度に影響を与える

B. 研究方法

1. 供試材料

宮崎県内の某食鳥処理場において、同一加工日のカット、整形、真空包装された生の胸肉（1パックに2個入り）を抜き取り、中心温度を0℃まで下げた後、検査室に搬

2. 実施時期と保存温度の設定

調査は、1999年8月、11月、2000年1月、7月、2001年1月の計5回実施した。最初の3回は、午前に加工されたものを0℃と4℃で保存した。残りの2回は午前と午後1番に処理されたものを供試し、0℃のみで保存した。保存は最長12日間まで行い、1回に3検体を用いて経時的に細菌学的検査を実施した。

3. 検査方法

1) 汚染指標細菌

胸肉の皮の付いていない側の筋肉表層部を削り取るように無菌的に採取し、これらを25g集めて1検体とした。これに225mlの滅菌した希釈液(10mMリン酸緩衝食塩液 pH7.2; PBS)を加え、ストマッカーで処理し10倍乳剤を作製し、試料原液とした。一般生菌数、大腸菌群数および低温細菌数の測定は、PBSにより試料原液の10倍階段希釈を作製し、それぞれ標準寒天培地(ニッスイ)、デソキシコレート培地(ニッスイ)、CVT寒天培地(ニッスイ)を用いた混釈培養法により測定した。

2) カンピロバクターの分離

フィルター増菌培養法とPCRを組み合わせた方法[1]で *Campylobacter jejuni/coli* を同時に分離・同定した。24穴マイクロプレートの各ウェルに増菌用培地として5%牛胎児血清添加ブルセラブロス0.6mlを入れ、底面にポアサイズ0.45μmのフィルターを装着した円筒セルを設置した。胸肉についている皮10gを90mlのPBSとともにストマッカー処理し、その0.1mlを各セルの中に入れ、42℃で48時間微好気培養を行った。フィルターを通過して増殖した菌は、Skirrow選択培地に塗抹して培養

すると同時に増菌培養液を遠心して集菌した後、DNAを簡易抽出法で分離し、PCRを実施した。カンピロバクターの検出は、1999年の8月と11月、2000年の7月(午前と午後)に実施した。

3) 低温細菌の菌種鑑別

鶏肉を低温保存した時に増殖する優勢菌種を決定するため、CVT寒天培地に接種した検査材料の最も希釈倍率の高かった平板から赤色コロニーを1個分離し、DNAを定法に従い抽出した。細菌の16S rRNA遺伝子に共通なプライマーを用いてPCRで増幅し、これを鋳型としたダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。得られた約500bpの塩基配列を用いて、GenBankのBlast Searchを用いたホモロジー検索を実施し、98%以上の一致率を示すものを分離菌種と決定した。

4) 試験管内における低温細菌とカンピロバクター混合菌液の増殖性と生残性

鶏肉から分離された低温細菌のうち、優勢に増殖した *Pseudomonas fluorescens* 8-0-2株と *C. jejuni* 81-176株の単独および混合菌液の増殖性・生残性を調べた。菌をミューラーヒントンブロスに浮遊させ、*P. fluorescens*は 10^2 cfu/mlに、*C. jejuni*は 10^4 cfu/mlに調整し、4℃で好氣的に静置培養して経時的に菌数を測定した。*P. fluorescens*の分離にはCVT寒天培地を、*C. jejuni*の分離にはSkirrow寒天培地を用いた。

C. 研究結果

1. 一般生菌および大腸菌群の増殖

平成11年度に実施した3回の検査で、一般生菌数が 10^3 ~ 10^4 cfu/gの範囲で検出

された(図1~3)。一方、大腸菌群数は8月に実施したものでは約 10^4 cfu/gと一般生菌数とほぼ同じレベルであったのに対し、11月と1月に実施したものでは 10^1 ~ 10^2 cfu/gと低い値であった。平成12年度に実施した2回の検査では、同一加工日の午前地午後に採取した検体について調べたところ、一般生菌数は 10^3 ~ 10^4 cfu/gの範囲で検出され、平成11年度の調査結果と同程度であり、実施時期や処理時間による汚染菌数の差は認められなかった(図5、図6)。大腸菌群数は処理時間による差は認められなかったが、夏季よりは冬季の方が汚染菌数が低い傾向を示した。胸肉を 0°C で保存した場合、一般生菌数および大腸菌群数は、観察した12日間ほとんど変化は見られなかったが、 4°C で保存した場合、12日後の両者の菌数は保存開始時の100~10000倍まで増殖した(図1~3、図5~8)。

2. 低温細菌の増殖

2000年の1月と7月、2001年の1月の試験において低温細菌数の測定を行った。保存開始時の低温細菌数は 10^3 ~ 10^4 cfu/gの範囲で検出され、季節的および処理時間による変動は認められなかった。 0°C の保存であっても低温細菌は保存日数の経過とともに増殖し、12日後の菌数は保存開始時の100倍近くまで増殖した(図4~8)。 4°C の保存では、 0°C の保存に比べ菌の増殖速度が速く、12日後では約 10^8 cfu/gに達した。 4°C の保存では、保存開始4日後から肉の腐敗臭、ドリップの増加と混濁が認められた。

3. 低温細菌の優勢菌種

2000年7月(午前と午後)および2001年1月に実施した検査で分離された低温細菌のうち、優勢に増殖した菌種を16S rRNAの塩基配列により決定したところ、保存開始時には異なる菌種が検出されたが、保存日数の経過とともに *Pseudomonas* 属菌が優勢菌種となり、単一菌種が優勢となる傾向を示した(表1)。

4. 鶏肉の保存日数とカンピロバクターの分離率

保存開始時の鶏肉の70%以上から本菌が分離された。分離されたカンピロバクターは、*C. jejuni*と*C. coli*の2菌種で、*C. jejuni*が優勢菌種であった。 0°C と 4°C の保存温度において、保存日数の経過とともに本菌の分離率は低下する傾向を示した(図9、図10)。

5. 試験管内における低温細菌とカンピロバクターの増殖性・生残性

低温細菌のうち優勢に増殖した *P. fluorescens* と *C. jejuni* の単独および混合菌液の 4°C での増殖性・生残性を調べた。その結果、単独、混合培養のいかにかわらず、低温細菌は日数の経過とともに増殖したが、カンピロバクターの菌数は観察期間を通してほとんど変化しなかった。

D. 考察

カンピロバクターによる食中毒は、近年、国内外で増加傾向にある。平成13年度の厚生科学研究班による国内の市販鶏肉の汚染実態調査では約70%の鶏肉が本菌に汚染されていることが明らかとなった。

カンピロバクターは微好気性菌で、30℃以下の温度では増殖できないため、低温保存食品中では増殖できない。一方、低温保存鶏肉では、処理工程で汚染を受けた低温細菌が増殖し、肉の鮮度に影響を与えることが知られている。今回は、低温保存下の鶏肉で増殖する低温細菌に着目し、カンピロバクターの分離率や生残性に影響しているかを調べた。

供試材料として用いたパック詰め鶏ムネ肉は、食鳥処理場でカットされ、表面温度をマイナス1℃から0℃まで下げた後、氷冷した状態で検査室に搬入された。したがって、得られた結果は出荷時の微生物汚染状況をほぼ反映していると考えてよい。保存温度を0℃と4℃に設定して、経時的に汚染指標細菌数を測定した結果、0℃では低温細菌の増殖は認められたが、一般生菌と大腸菌群数の変動はほとんど認められなかった。一方、4℃の保存では、すべての指標細菌が増殖し、鮮度の早期低下が認められた。保存条件が同一であればいったん増え始めた微生物の増殖速度は一定であるが、増殖を始めるまでの期間、すなわちLag phaseは、初期汚染細菌数が少ないほど長くなることが知られている。したがって、微生物増殖の面から見ても、初期の汚染細菌数をできるだけ低く制御することは、食品衛生上大変効果のあることである。このことは、1999年に実施した、大腸菌群数の高かった8月と低かった11月の検査で、4℃で保存した鶏肉における大腸菌群数の増殖曲線によく現れている。

低温細菌は病原細菌ではないが、低温保存下で主として動物性蛋白質食品の腐敗、変敗に関与する細菌のグループで、大部分

がグラム陰性細菌に属する。今回分離された低温細菌では、*Pseudomonas* 属菌が最も優勢に増殖し、季節や処理時間帯による優勢菌種の違いは認められなかった。今回供試した鶏肉は、真空包装されていたが、好気生菌であるシュードモナスが増殖したのは、真空包装が不完全でパック内に空気が残存していたためというよりはむしろ、包装に使用したフィルムが酸素透過性であったためであると思われる。低温細菌は0℃の保存でも鶏肉中で増殖することから、低温細菌の汚染と流通過程における温度管理が鮮度保持に影響する大きな要因となることが示唆された。

カンピロバクターは、保存試験開始時には鶏肉から高率に分離されたが、分離率は肉の保存日数とともに低下した。本菌の分離率が保存日数の経過とともに低下したのは、菌自体の生存率が低下したか、低温細菌などその他の菌が増殖し、分離率に影響を与えたことなどが考えられた。そこで今回は低温細菌に着目し、試験管内でカンピロバクターとの混合菌液を作製し、好氣的低温保存下で経時的にそれらの増殖性・生残性を調べた。その結果、低温細菌は培養日数の経過とともに増殖し、鶏肉中と同様の菌の増殖が認められたが、カンピロバクターの生残性は低温細菌の増殖によって影響を受けなかった。今後は、カンピロバクターの分離率の低下の原因について、低温細菌以外の汚染細菌の影響や、その他の要因について検討する必要がある。

カンピロバクターの分離率は保存日数の経過とともに低下したが、カット包装鶏肉が食鳥肉処理場から搬出され、流通・販売・消費の各過程においてカンピロバクターは

生残していることが考えられ、処理場における衛生対策、販売における汚染拡大防止策等が必要である。

E. 結論

鶏肉の鮮度を左右する汚染細菌は、包装時の汚染レベルと保存温度に大きく影響されることが判った。特に低温細菌の汚染と流通過程における温度管理が鮮度保持に影響する大きな要因となることが示唆された。カンピロバクターの分離率は保存日数の経過とともに低下したが、試験管内では低温細菌の影響を受けなかった。カンピロバクターは鶏肉の消費期限内には生存している

と考えられ、その衛生対策が必要である。

F. 参考文献

- 1 . Misawa, N., Kawashima, K., Kawamoto, H., Kondo, F., Development of a combined filtration enrichment culture followed by a one-step duplex PCR technique for the rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human faecal samples. *J. Med. Microbiol.*, 51(1):86-89, 2002.

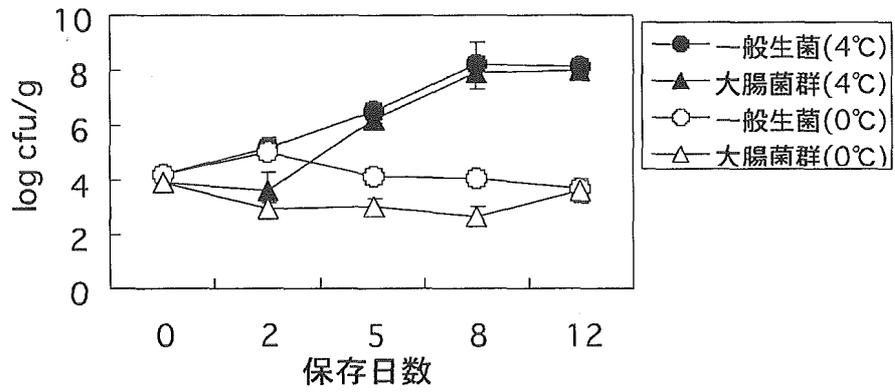


図1 保存温度と汚染細菌の増殖 (1999年8月実施)

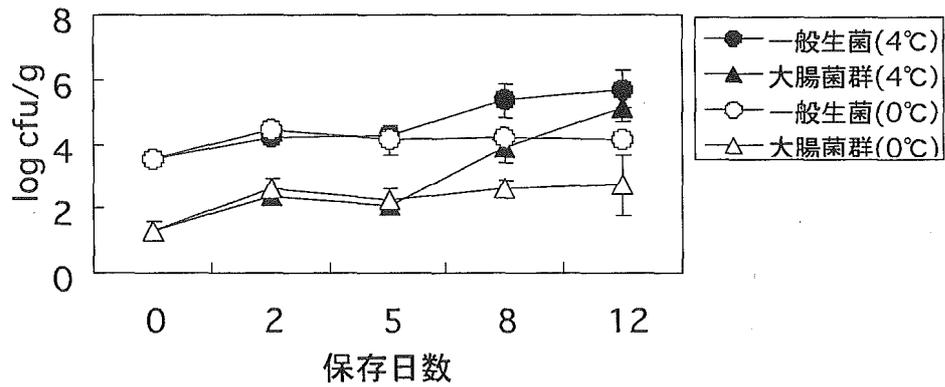


図2 保存温度と汚染細菌の増殖 (1999年11月実施)