

した。また、採取時の温度を測定した。

(定性試験) 湯漬け水 100mL に等量の 2 倍濃度プレストンブイオンを添加し培養後、CCDA 培地で分離した。

(定量試験-MPN 法) 湯漬け水の 10mL、1mL、0.1mL について 3 管法で実施した。10mL 試料には等量の 2 倍濃度のプレストンブイオンを加え、1mL、0.1mL 試料はプレストンブイオンに加えて培養し、CCDA 培地で分離し、カンピロバクター陽性管数により MPN を算出した。

#### 7) チラー水

対象鶏舎群のとたいが冷却されている間に 1,000mL 採取した。採取試料はチオ硫酸ナトリウムで塩素を中和した後試験に供した。チラー水は、3,000rpm で 20 分間遠心し、沈渣にプレストンブイオンを 100mL 添加混和し培養後、CCDA 培地で分離した。

#### 8) 盲腸内容 (1 羽毎)

盲腸は脂肪をできる限り除き、一羽分ずつ滅菌ポリ袋に採取し、-40℃で急速冷凍し、凍結後約 5g を別の滅菌ポリ袋に採取し、滅菌生理食塩水で 10 倍希釈とし試験溶液とした。試験溶液は滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈し、その 100  $\mu$ L を CCDA 培地に滴下し培養した (Miles-Misra 法)。出現したコロニーを形態に従い分類し計数し、*Campylobacter* spp と同定した形態を示すコロニーの数をもってコロニーカウントとした。

#### 9) 菌株の血清型別ならびに PFGE 型

検出菌株の血清型別は、分離した

*Campylobacter* spp 70 株 (R 群 III 期 40 株、R 群 IV 期 30 株) について、市販の PHA 法によるカンピロバクター血清型別試薬(テンカ生研、東京)を用いて Penner 型別を実施した。

検出した菌株の内、検出箇所毎に合計 13 株 (R 群 III 期 6 株、R 群 IV 期 7 株) 選択し PFGE 法による DNA 切断パターンによる遺伝子型別を行い、由来の推定を行った。

プラグの作成から電気泳動は、Gibson, J R *et al* (1994) (12) に準拠して実施した。1 コロニーを釣菌し、血液寒天培地で菌苔を作成した。菌体を滅菌蒸留水 200  $\mu$ l に懸濁し、加熱溶解後 50℃に冷却したアガロース (10mM Tris-HCl [pH8.0], 1mM EDTA [pH8.0], 1.2% [W/V]メカヘースアガロース(BIO-RAD, USA)) を等量混和しプラグを作成した。固化したアガロースブロックは 2mL の リゾチーム溶液 (0.5M-EDTA [pH8.0], Lysozyme [3mg/mL]) に移し、37℃で 6 時間振盪 (70rev/min) しなからインキュベートした。リゾチーム溶液を取り除き、プロテナーゼ K 溶液 (0.5mM-EDTA [pH8.0], Proteinase K [1mg/ml], 1% [W/V] N-lauroyl sarcosine) に入れ、振盪 (70rev/min) しなから 55℃で一晩インキュベートした。その後、プラグは Pefabloc 溶液 (10mM Tris-HCl [pH8.0], 1mM EDTA [pH8.0], 2mM Pefabloc) に移し室温で 30 分間酵素失活を行い、TE buffer (10mM Tris-HCl [pH8.0], 1mM EDTA [pH 8.0]) で 2 回洗浄後、制限酵素 buffer で平衡化を行い、*Kpn* I 処理 (50 U/プラグ) を 37℃

で16時間行った。

PFGE は CHEF-DR (BIO-RAD, USA)を用い、1%[W/V] PFC アガロース (BIO-RAD, USA) ゲルに包埋した試料を 0.5×TBE バッファー中で、パルスタイム 0.5 秒から 30 秒、200V、14°C、20 時間の条件でおこなった。電気泳動後、Et-Br で染色し、紫外線照射下で観察した。PFGE 法により得た DNA 切断パターンは Foto/Eclips™ (Fotodyne, USA) により磁気データとし、BioNumerics ver 3.0 (Applied Math, USA) を用いて Pulsotype のコンピュータデータヘース化を行うとともに UPGMA (unweighted pair group method with averages) 法により菌株間の相同性を tolerance 1.5%の条件で比較した。

## C 研究結果

### 1) 盲腸内容物 (表-2)

食鳥の盲腸内容物中の *Campylobacter* spp の検出は、鶏舎群により差が認められた。R 鶏舎群を除く他の 17 鶏舎群の盲腸内容物からは、すべての時期で *Campylobacter* spp は検出されなかった。

R 鶏舎群では II 期 3/5 群、III 期 2/5 群、IV 期 5/5 群に *C. jejuni* が検出されたか、3 月に初生ヒナを入舎し育成した I 期の盲腸内容物から *Campylobacter* spp は検出されなかった。

### 2) 内臓摘出後とたい洗浄液 (表-3)

R ならびに N 鶏舎群の処理時における腸管内容物汚染の有無によるとたいの

*Campylobacter* spp 数の比較を行った。

R 鶏舎群のすべてのとたい洗浄液から定性的に *C. jejuni* を検出した (III および IV 期)。IV 期 R 鶏舎群についてコロニーカウント法により、非汚染群で  $1.1 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^6$  CFU/羽 (中央値  $3.6 \times 10^5$  CFU/羽)、非汚染群で  $8.4 \times 10^5 \sim 4.3 \times 10^6$  CFU/羽 (中央値  $2.8 \times 10^5$  CFU/羽) の *C. jejuni* を確認した。MPN 法では 3 濃度の 3 管すべてから *C. jejuni* が確認された。

N 鶏舎群のすべてのとたい洗浄液から *Campylobacter* spp は検出されなかった (MPN 法  $<0.3$  MPN/g、コロニーカウント  $<1.0 \times 10^2$  CFU/g)。

### 3) 鶏部分肉 (表-4)

R 鶏舎群食鳥とたいの加工で製造された鶏部分肉 (販売用パック詰めモモ肉) すべてから *C. jejuni* が検出された (III および IV 期)。また、IV 期の鶏部分肉の MPN 法では  $1.5 \sim 24.0$  MPN/g の *C. jejuni* が検出された。

N 鶏舎群食鳥とたいの加工で製造された鶏部分肉から *Campylobacter* spp は検出されなかった ( $<0.3$  MPN/g)。

### 4) 加工器具・手袋の拭き取り (表-5)

R 鶏舎群食鳥とたい加工時の加工場で使用されるまな板 (III・IV 期) ならびに手袋 (IV 期) から低い頻度で *C. jejuni* が検出された。包丁の拭き取り試料からは *Campylobacter* spp は検出されなかった (III・IV 期)。

N 鶏舎群食鳥とたい加工時の加工場で使用されるまな板、包丁ならびに手袋が

ら *Campylobacter* spp は検出されなかった (III 期)。

#### 5) 湯漬け水・チラー水

R 鶏舎群処理時の湯漬け水温度は、第一湯漬け槽で 50°C、第二湯漬け槽で 60°C であった (IV 期)。外気か下がった IV 期に第一湯漬け槽は 50°C に下がり、規定の 60°C に達していなかった。第一湯漬け槽水から 9 MPN/100mL の *C. jejuni* が検出された。規定の 60°C を保持していた第二湯漬け槽水から *Campylobacter* spp は検出されなかった (<3 MPN/100mL)。

一方、R 鶏舎群 (III および IV 期) ならびに N 鶏舎群 (III 期) 処理時のチラー水から *Campylobacter* spp は検出されなかった。

#### 6) 一羽毎の盲腸内容物

IV 期の R 鶏舎群盲腸内容物の *Campylobacter* spp コロニーカウントは、 $6.0 \times 10^2 \sim 8.5 \times 10^6$  CFU/g (中央値  $1.1 \times 10^5$  CFU/g) を示し、鶏個体により盲腸内菌数か異なるものの、採取した 50 試料すべてから *C. jejuni* が検出された。

一方、N 鶏舎群ではすべての試料から *Campylobacter* spp は検出されなかった。

#### 7) 検出菌株の Penner 型別ならびに PFGE 型 (表-7)

III および IV 期に R 鶏舎群の食鳥ならびに施設、最終製品試料から検出された *C. jejuni* は、III 期では Penner Z 群、IV 期では Penner UT であった。III と IV 期では同一の鶏舎群であるものの鶏舎の

棟が異なっていた。PFGE を用いた DNA 切断パターンは、Penner Z 群・Penner UT でそれぞれ単一のパターンを示した。すなわち、III 期は Penner Z 群で PFGE 型 CC19/Sep/I の *C. jejuni* が盲腸便、とたい洗浄水および鶏部分肉から、IV 期は Penner UT で PFGE 型 CF44/Nov/I の *C. jejuni* が盲腸便、湯漬け水、とたい洗浄水、加工場器具拭き取りおよび鶏部分肉から検出された。

#### D 考察

食鳥処理場のとたい、食肉、器具・器材や環境試料から、カンピロバクターは高率に検出されてきた (4, 10, 13)。これにより、市販鶏肉のカンピロバクター汚染が食鳥処理場に由来すると考えられ、生産された鶏肉の *Campylobacter* spp 汚染の原因として、ニワトリの高い保菌率、湯漬け水、チラー水、鶏肉加工時の手袋や器具が示唆された (4)。ニワトリの高い保菌率は、食鳥処理の過程における衛生対策が十分とられない場合、腸管破損や羽毛の糞便汚染に伴い、*Campylobacter* spp の二次汚染もしくは交差汚染の原因となりうると考えられる。今回の調査結果を見ると、1 鶏舎群以外は 4 期に渡り盲腸内容物から *Campylobacter* spp は検出されず、衛生的な飼育環境下にあると考えられる。衛生的な飼育環境と考えられる N 鶏舎群の処理加工日には、内臓摘出後とたい、加工場内の手袋・包丁・まな板をはじめ、最終製品である鶏肉部分肉からも *Campylobacter* spp が検出されなかった (III 期) が、盲腸内容物から *Campylobacter jejuni* が検出された R

鶏舎群処理日には、内臓摘出後とたい (III・IV期)、加工場内の手袋(IV期)・まな板(III・IV期)、鶏肉部分肉(III・IV期)、湯漬け水(IV期)から *Campylobacter jejuni* が検出され、搬入鶏の保菌の有無が食鳥処理場内の衛生状態を左右するものと考えられる。

鶏の腸内容物の処理場内汚染防止は重要な管理ポイントと考えられる。処理場内汚染防止を評価する手段として内臓摘出後とたいの腸管破損率が指標になると考えられてきた(13)。調査対象食鳥処理場における内臓摘出機による腸管破損率は近隣の食鳥処理場における腸管破損率と比較し極めて低く(0.85%)内臓摘出機の調整が的確に行われていることか推測された。また、(a) 摘出内臓がとたいの流れに同期する内臓用専用レーンに摘出後すくに移される、(b) 内臓摘出後とたいは遅滞なく 30ppm の塩素水噴霧により消毒されるなど、他の食鳥処理場にみられない設備が備えてあった(平成14年度報告に詳述)。これらの機器調整や施設整備は腸管破損の防止ならびに腸管内容物汚染の防止対策として有効と考えられた。リンス法は食鳥とたいの表面ならびに胸腔・腹腔内の汚染度を測定することから、内臓摘出後の洗浄・消毒効果の評価が容易にできる反面、鶏個体の表面積が異なるため、単位面積当たりの菌数として群間評価が難しい。そこで、とたい重量から表面積を求める回帰式(10)を用いた結果、汚染群は  $94 \times 10^2 \text{CFU/cm}^2$ 、非汚染群は  $13 \times 10^2 \text{CFU/cm}^2$  であった。内臓摘出後とたいの洗浄液コロニーカウントの結果は、

とたいの肉眼的腸管内容物汚染の有無で区分した群間で 1/10 以下の差に止まり、一見衛生的と考えられる内臓摘出機の調整や施設整備を行っても、*Campylobacter* spp 汚染を制御するには効果的な方法となりえないことが示唆された。

今回の調査では、*C. jejuni* Penner Z 群および Penner UT がそれぞれ III 期および IV 期の食鳥盲腸から最終製品である鶏部分肉まで処理・加工工程毎に検出され、PFGE による DNA 切断パターンにより同一の由来と考えられる 2 型がそれぞれの期に認められた。由来が同一の *C. jejuni* 株が農場の鶏に広く蔓延し、食鳥処理の過程で菌数の増減はあるものの最終製品まで汚染していることを示している。III 期と IV 期に別の Penner 型と PFGE 型が検出されたことは、生産農場内で環境などから不連続な *C. jejuni* の暴露を受け、食糞など鶏の生態に乗り、同一鶏舎内へ急速に伝播したことか考えられるが、III 期と IV 期では採材した鶏の飼育棟が異なること、それぞれの期に 1 棟の調査しか行わなかったことから、環境調査を含めた今後の調査結果により更に *C. jejuni* 汚染のメカニズムを検証する必要かあると考えられる。

## E 結論

北海道内の一食鳥処理場における *Campylobacter* spp の汚染実態調査を実施した。

処理場内汚染の原因の一つと考えられる鶏盲腸内 *C. jejuni* は、調査した全ての期間で 17 箇所(鶏舎群)から検出されなかった。17 箇所中 1 箇所の鶏の処理・加

工時に処理途中のとたい、加工器具、手袋、最終製品を検査した結果、*C jejuni* は検出されなかった。衛生的な食鳥飼育により、処理場内の *C jejuni* 汚染がなかったものと考えられた。

1 箇所の鶏舎群では盲腸内容物、処理場内のとたい、加工器具、最終製品から *C jejuni* が検出された。III および IV 期の *C jejuni* はそれぞれ Penner Z 群と Penner UT が検出され、PFGE 型も群内では単一のものであった。育成環境中の鶏が暴露され盲腸内の *C jejuni* が処理場内および最終製品を汚染したものと考えられた。

食鳥処理場内の衛生を確保するためには生産から流通・消費までの「Total Sanitation」の必要性を示唆しているものと考えられた。

## F 参考文献

- (1) 厚生労働省食品保健課 (2003) 食中毒発生状況, 食品衛生研究, 53, 66-148
- (2) 北海道保健福祉部食品衛生課 (2003) 平成 14 年度食品衛生課事業報告
- (3) Ono K and Yamamoto K (1999) Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan, J Food Microbiol, 47, 211-219
- (4) 伊藤 武ら (1987) 市販食肉および食肉店舗や食鳥処理場の環境における *Campylobacter* の汚染状況ならびに分離菌株の血清型に関する研究, 感染症学雑誌, 62(1), 17-25
- (5) 伊藤 武 (2000) 7 *Campylobacter*

*jejuni*, 新訂食水系感染症と細菌性食中毒, 中央法規, 336-362

(6) 厚生省生活衛生局 (1990) 食品衛生検査指針 微生物編, 日本食品衛生協会, 425pp

(7) 伊藤 武ら (1984) *Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* の各種生化学性状ならびに菌体脂肪酸組成の検討, 東京衛研年報, 35, 8-17

(8) Stonnet, V and Guesdon, J-L (1993) *Campylobacter jejuni* Specific oligo-nucleotides and DNA probes for use in polymerase chain reaction-based diagnosis, FEMS Immunol Medical Microbiol, 7, 337-344

(9) Stonnet, V et al (1995) Rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from clinical specimens using the polymerase chain reaction, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 14, 355-359

(10) 佐藤 博ら (2001) 食鳥と体の細菌学的サンプリング方法の検討とフローイラーと体の細菌汚染調査, 日獣会誌, 54, 857~861

(11) 坂崎利一ら (1986) 培地検査法, 新細菌培地学講座-上- 第二版, 近代出版, 183-192

(12) Gibson, JR et al (1994) Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*, Letters Appl Microbiol, 19, 357-358

(13) Wempe, JM et al (1983) Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Two California Chicken Processing

Plants , Appl Environ Microbiol , 45,  
355-359

(14) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課  
(1992) 食鳥処理場における HACCP  
方式による衛生管理指針, 48pp

表-1 鶏舎群による調査期間の分割と初生ヒナの入舎時期

期	I	II	III	IV
成鳥搬入時期	5 6月	7 8月	9・10月	11 12月
初生ヒナの入舎時期	3 4月	5・6月	7 8月	9・10月

表-2 鶏舎群別盲腸内容物の *Campylobacter jejuni* 検出状況 (定性検査)

期 鶏舎群名	I (5 6月処理)	II (7 8月処理)	III (9 10月処理)	IV (11 12月処理)
A	0/5*	0/5	0/5	0/5
B	0/5	0/5	0/5	0/5
C	0/5	0/5	0/5	0/5
D	0/5	0/5	0/5	0/5
E	0/5	0/5	0/5	0/5
F	0/5	0/5	0/5	0/5
G	0/5	0/5	0/5	0/5
H	0/5	0/5	0/5	0/5
I	0/5	0/5	0/5	0/5
J	0/5	0/5	0/5	0/5
K	0/5	0/5	0/5	0/5
L	0/5	0/5	0/5	0/5
M	0/5	0/5	0/5	0/5
N	0/5	0/5	0/5	0/5
O	0/5	0/5	0/5	0/5
P	0/5	0/5	0/5	0/5
Q	0/5	0/5	0/5	0/5
R	0/5	3/5	2/5	5/5

\* 検出群数/ 検査群数 (1群10羽)

表-3 内臓摘出後とたい洗浄液中の *Campylobacter* spp 数 単位 CFU/羽

鶏舎群 (期)		コロニーカウント、MPN				
R (IV)	非汚染群*	1.7×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>5</sup>	2.0×10 <sup>5</sup>	3.5×10 <sup>5</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>
		3.7×10 <sup>5</sup>	3.9×10 <sup>5</sup>	2.3×10 <sup>5</sup>	4.5×10 <sup>5</sup>	4.2×10 <sup>5</sup>
	中央値 3.6×10 <sup>5</sup>					
	汚染群**	2.8×10 <sup>6</sup>	4.3×10 <sup>6</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>	8.4×10 <sup>5</sup>	3.4×10 <sup>6</sup>
中央値 2.8×10 <sup>6</sup>						
N (III)	非汚染群*	全試料 <1.0×10 <sup>2</sup> (<0.3 MPN/羽)				
	汚染群**	全試料 <1.0×10 <sup>2</sup> (<0.3 MPN/羽)				

\* 肉眼で腸管内容物汚染のないもの \*\* 肉眼で腸管内容物汚染のあるもの

表-4 鶏部分肉の *Campylobacter jejuni* 定量試験結果 単位 MPN/g

鶏舎群 (期)	製品名	1	2	3	4	5
R (IV)	モモ肉	15.0	2.3	24.0	1.5	3.8
N (III)	モモ肉	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3

表-5 処理時の加工施設における器具・手袋の *Campylobacter jejuni* 定性検査結果

鶏舎群 (期)	ライン名	器具など	陽性試料数/ 検査試料数	ライン名	器具など	陽性試料数/ 検査試料数
R (III)	モモ肉 加工	まな板	2/5	ムネ肉 加工	まな板	3/5
		包丁	0/5		包丁	0/5
		手袋	0/5		手袋	0/5
R (IV)	モモ肉 加工	まな板	2/5	ムネ肉 加工	まな板	1/5
		包丁	0/5		包丁	0/5
		手袋	2/5		手袋	1/5
N (III)	モモ肉 加工	まな板	0/5	ムネ肉 加工	まな板	0/5
		包丁	0/5		包丁	0/5
		手袋	0/5		手袋	0/5



表-6 盲腸内容物 50 試料の *Campylobacter* spp 数

単位 CFU/g

鶏舎群 (期)	コロニーカウント				
	R (IV)	$1.6 \times 10^6$	$4.0 \times 10^5$	$9.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$
$4.8 \times 10^3$		$1.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^6$	$3.2 \times 10^4$
$2.4 \times 10^6$		$2.5 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$6.8 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$
$2.8 \times 10^4$		$1.9 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^6$	$9.5 \times 10^5$
$4.3 \times 10^4$		$3.7 \times 10^5$	$8.5 \times 10^6$	$5.2 \times 10^5$	$5.9 \times 10^4$
$2.2 \times 10^6$		$2.3 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$
$2.1 \times 10^4$		$4.7 \times 10^5$	$6.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^3$
$1.4 \times 10^3$		$7.0 \times 10^5$	$8.3 \times 10^4$	$2.2 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$
$2.3 \times 10^4$		$2.3 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$
$3.0 \times 10^4$		$1.0 \times 10^5$	$6.7 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$
	中央値		$1.1 \times 10^5$		
N (III)	全試料 $< 1.0 \times 10^2$				

表-7 R 鶏舎群食鳥等から分離した *Campylobacter* spp の菌種および Penner 型別

	III 期		IV 期	
	食鳥盲腸便	<i>C jejuni</i>	Penner Z	<i>C jejuni</i>
湯漬け水	NT	NT	<i>C jejuni</i>	Penner UT
とたいすすぎ水	<i>C jejuni</i>	Penner Z	<i>C jejuni</i>	Penner UT
チラー水	ND	ND	ND	ND
カット工場拭き取り	<i>C jejuni</i>	ND	<i>C jejuni</i>	Penner UT
製品	<i>C jejuni</i>	Penner Z	<i>C jejuni</i>	Penner UT

Penner UT 市販 (デンカ生研) 型別血清により型別不能 NT 検査実施せず

ND 不検出

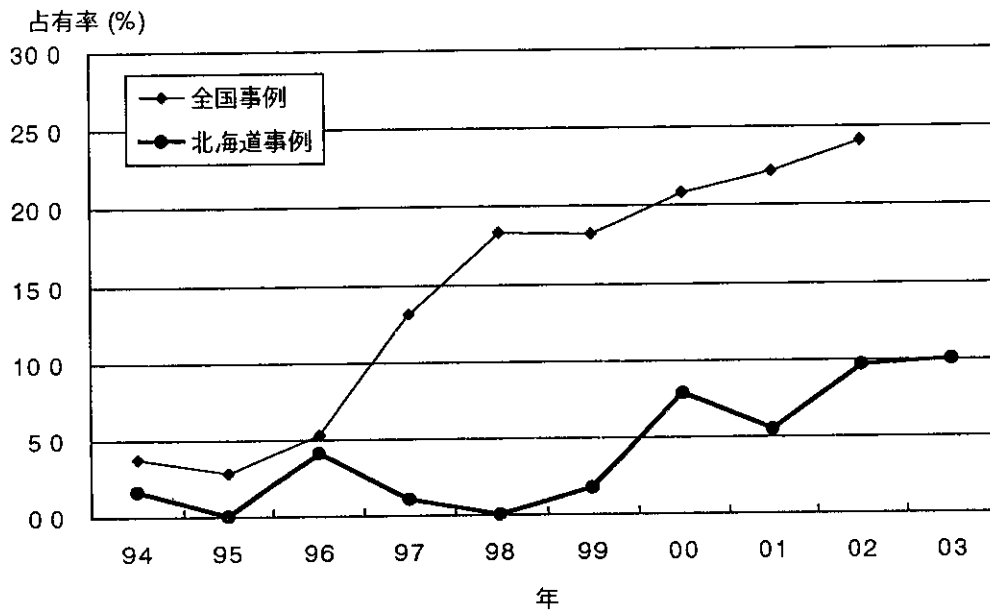
表-8 R 鶏舎群 III・IV 期に検出した *Campylobacter jejuni* の PFGE 型

(Kpn I による型別)

	III 期	IV 期
食鳥盲腸便	CC19/ Sep/ I	CF44/ Nov/ I
とたいすすぎ水	CC19/ Sep/ I	CF44/ Nov/ I
湯漬け水	NT	CF44/ Nov/ I
カット工場拭き取り	NT	CF44/ Nov/ I
製品	CC19/ Sep/ I	CF44/ Nov/ I

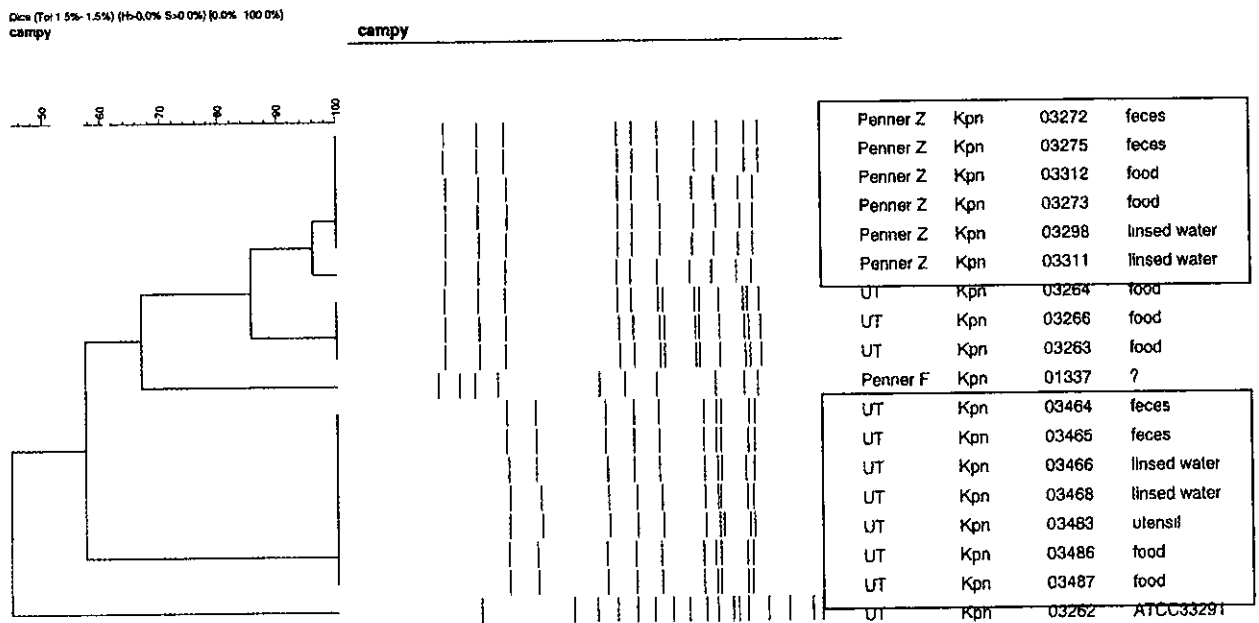
NT 検査実施せず

図1 カンピロバクター食中毒事例の食中毒事例に対する占有率の年推移



2003年の北海道における食中毒事例データは北海道保健福祉部食品衛生課「食中毒発生状況」(未発表)による

図2 *Campylobacter jejuni* 分離株の Dendrogram



上囲みは R 鶏舎 Penner Z 群、下囲みは R 鶏舎 Penner UT

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

*Campylobacter jejuni* の凍結・解凍処理に対する生残性

鶏肉中のカンピロバクターの凍結・解凍による菌数の変化を調べた。1回の凍結・解凍では、カンピロバクター菌数は、凍結時間にはあまり左右されず 1 log MPN/100g 前後の減少がみられる検体が多かった。凍結・解凍の繰り返し実験においては、回数が増す毎に徐々に菌数が減少することを確認され、7回の凍結・解凍で 2.1 log MPN/100g の菌数減少がみられたが、少数の菌は生残していた。PBS、トリップ、筋肉乳剤および皮乳剤にカンピロバクターを添加し、凍結・解凍操作を繰り返し行ったところ、トリップ中の菌が最も生残性が高いことが確認された。

川森文彦 静岡県環境衛生科学研究所  
小野一晃 埼玉県衛生研究所  
重茂克彦 岩手大学

A 研究目的

カンピロバクターの生体外での増殖には、30℃以上の温度と微好気環境が必要となるので、鶏肉に付着した菌は流通や

保存時には、増殖しないものと考えられている。鶏肉に付着したカンピロバクターは 4℃で保存した場合、48 時間後でもほとんど菌数が減少しないことが報告されており、冷蔵状態での短時間流通では、菌数の減少は少ないと思われる。しかし、凍結・解凍操作により本菌が高率に死滅することが考えられ、事実、通常冷凍状

態で輸入される外国産鶏肉は国産鶏肉に比べ、カンピロバクター菌数が少ないことが確認されている。今回は、鶏肉に付着したカンピロバクターの冷凍・解凍に対する生残性を定量的に検討した。

## B 検査方法

### 1) 人工的に *C. jejuni* を付着させた鶏肉の凍結・解凍操作および菌数測定法

*Campylobacter jejuni* (鶏肉由来、Penner B 群) を  $10^2$  CFU/ml の濃度に調製した菌液 (BHI ブロステ培養し、PBS で希釈) 200ml を入れたストマッカー袋を 6 袋用意し、各々に鶏肉 (市販手羽先) を 5 個ずつ入れ、ヒートシールした後、もみ洗うようにして菌を付着させた。開封後、ペーパータオルで余分な液を拭き取り、実験に供した。菌を付着させた手羽先 28 検体をストマッカー袋 (7 検体入り 2 袋、2 検体入り 7 袋) に入れ、ヒートシールした後、 $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結させた。凍結・解凍繰り返し実験では 6、24、30、48、54、72 および 78 時間後に 7 検体入りの 2 袋を取り出し、そのつと  $25^{\circ}\text{C}$  で 30~60 分かけ解凍後、各袋から 1 検体ずつ取り出し、この 2 検体から採取された 25g について菌数を測定し、残りの検体はシール後、再度凍結した。1 回凍結のみの生残実験では、24、30、48、54、72 および 78 時間後に 2 検体入りの袋を 1 袋ずつ  $25^{\circ}\text{C}$  で 30~60 分かけ解凍し、この 2 検体から採取された 25g について菌数を測定した。なお、陽性コントロール (菌接種直後) の 2 検体および陰性コントロール (菌未接種) の 4 検体について、2 検体ずつプールし、菌数を測定した。

2 回目の実験では、凍結・解凍繰り返

し実験において、2 検体ずつ 1 袋に入れ、密封した状態で凍結・解凍を繰り返したこと以外は、1 回目と同様の方法で行った。

菌数測定は以下のとおり MPN 法で行った。検体 25g を Preston 増菌培地 100ml の入ったストマッカー袋に入れ、ストマッキング後、懸濁液を滅菌中試験管に 10ml ずつ 3 本に分注した。さらに、懸濁液 1ml および 0.1ml を、それぞれ、Preston 増菌培地 10ml を入れた中試験管 3 本ずつに分注した。これらの中試験管を  $42^{\circ}\text{C}$  で 24 時間、微好気培養を行い、各培養液の 1 白金耳を CCDA 培地に塗抹した。 $42^{\circ}\text{C}$  で 48 時間、微好気培養後、カンピロバクターのコロニーの有無を観察し、MPN 3 本法の菌数表から検体の菌数を算出した。

### 2) カンピロバクター汚染鶏肉の凍結・解凍操作および菌数測定法

市販鶏肉 6 検体 (むね肉 3 検体、もも肉 3 検体) について、凍結前、凍結・解凍 1 回 (24 時間) 後、凍結・解凍 2 回 (48 時間) 後に各検体から 25g ずつ採取し、MPN 法により菌数を測定した。

### 3) *C. jejuni* を添加した PBS、トリップ、筋肉乳剤および皮乳剤の凍結・解凍操作および菌数測定法

凍結融解した鶏もも肉からトリップ液を採取した後、筋肉部分と皮部分を分け、それぞれをホモシナイスした。PBS (1ml)、トリップ (1ml)、筋肉乳剤 (1g) および皮乳剤 (1g) を 15ml 遠心管に入れたものを各種類 10 本ずつ用意した。それぞれの遠心管に  $10^6$  CFU/ml の濃度に調製した *C. jejuni* 菌液 (BHI ブロステ培養し、PBS で希釈) を  $100\ \mu\text{l}$  ずつ添加し、攪拌後、

各種類 1 本についてカンピロバクター菌数を測定した。残りの各 9 本は $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結させ、24 時間後に全検体を解凍 ( $25^{\circ}\text{C}$ 、30 分) 後、各種類 1 検体について菌数を測定した。残りの検体については、再び凍結し、24 時間ごとに凍結・解凍を繰り返す、そのつど、各種類 1 検体ずつ菌数を測定した。

菌数測定はプレート法により行った。すなわち、検体 1ml あるいは 1g の入った遠心管に PBS 4ml を加え、攪拌した。この液を 5 倍希釈液とし、PBS で 10 段階希釈系列を作製した。各希釈検体の 200  $\mu\text{l}$  を CCDA 培地にコンラージ棒を用いて塗抹後、微好気、 $42^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養し、計測可能な希釈の平板のコロニー数を計測し、検体の菌数を算出した。

## C 研究結果

### 1) 人工的に菌を接種した鶏肉における

#### *C. jejuni* の凍結・解凍に対する生残性

1 回目の実験では、1 回の凍結・解凍で  $1.0 \log \text{MPN}/100\text{g}$  の菌の減少がみられたが、それ以後は凍結・解凍を繰り返してもわずかな菌数の減少しかみられず、7 回目の解凍後でも  $1.4 \log \text{MPN}/100\text{g}$  の菌数減少にとどまった (表 1)。2 回目の実験では、1 回の凍結・解凍では、菌の減少は  $0.3 \log \text{MPN}/100\text{g}$  であったが、凍結・解凍の回数が増えるにつれ、徐々に菌数が減少し、7 回解凍時で  $2.1 \log \text{MPN}/100\text{g}$  の減少が確認された。一方、凍結・解凍 1 回のみの実験では、凍結時間の長さに左右されず、凍結前に比へ  $1 \log \text{MPN}/100\text{g}$  前後の菌数減少がみられる検体が多かった。

### 2) カンピロバクター汚染鶏肉における凍結・解凍に対する菌の生残性

鶏肉 6 検体 (菌数  $10^2 \sim 10^3 \text{MPN}/100\text{g}$ ) について凍結・解凍操作による菌数の減少を調べたが、2 回の凍結・解凍により、もも肉からは菌が検出されなくなったが、むね肉の 3 検体は  $10^1 \text{MPN}/100\text{g}$  台の菌が生残していた (表 2)。

### 3) PBS、ドリップ、筋肉乳剤および皮乳剤中での菌の凍結・解凍に対する生残性

4 系統とも凍結・解凍を繰り返すことにより徐々に菌数は減少したが、減少速度はドリップと筋肉中の菌が PBS と皮中の菌に比へ緩やかであった (図 1)。カンピロバクターが検出できなくなったのは、PBS で 6 回解凍時、皮で 7 回解凍時、筋肉で 9 回解凍時であったがドリップ中の菌は 9 回の凍結・解凍後でも  $7.5 \times 10^1 \text{CFU/g}$  の菌が生残していた。

## D 考察

人工的に菌を付着させた鶏肉の実験においては、2 回目の実験で、凍結回数が増すにつれ菌数がほぼ減少する傾向がみられたが、1 回目の実験では凍結回数と菌数減少には明確な相関はみられなかった。1 回目の実験では、1 袋に 7 検体入れ、解凍するたびに 1 検体ずつ抜き取る方法であったので、凍結回数が増えるにつれ、ドリップ量が増え、カンピロバクターが生残しやすい状態になり、菌数の減少が抑えられたことが考えられる。このことは、今回の実験でドリップ中のカンピロバクターが最も凍結・解凍に対する生残性が高かったことから推測できる。

凍結・解凍が 1 回のみの実験では、凍結時間の長短にかかわらず、1 log MPN/100g 程度の菌数減少にとどまっております。少なくとも数日間の期間であれば凍結中の鶏肉付着カンピロバクターは安定しており、主に凍結時あるいは解凍時に菌の死滅が起きることが推測される。カンピロバクターに汚染されていた鶏肉においても、1 回の凍結・解凍により 0.4～0.8 log MPN/100g の菌の減少がみられたことから、外国産鶏肉は凍結・解凍の工程を経ることによってカンピロバクター菌数がパック時よりも減少していることが推測される。

PBS、ドリップ、筋肉乳剤および皮乳剤中のカンピロバクター生残実験では、ドリップ中の生残性が最も高かったことから、市販鶏肉のドリップ中で本菌が長時間、生存していることが考えられる。このことから、鶏肉のドリップによる他の食材や調理器具の汚染には、食中毒防止の観点から特に注意する必要があるものと思われる。

#### E 参考文献

- 1) Blankenship, L C and Craven, S E  
*Campylobacter jejuni* survival in chicken meat as a function of temperature Appl Environ Microbiol 44, 88-92 (1982)
- 2) Solow, B T, Cloak, O M and Frataico, P M  
Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin J Food Prot 66, 2023-2031 (2003)
- 3) 小野一晃、辻りえ、安藤陽子、大塚佳代子、柴田 穰、斎藤章暢、増谷寿彦

国産鶏肉および輸入鶏肉におけるカンピロバクターの汚染状況 日獣会誌 56, 103-105 (2003)

表 1 鶏肉に付着させた *C. jejuni* の凍結・解凍に対する生  
残性

時間	凍結・解凍繰り返し後の菌数 (MPN/100g)		凍結 解凍 1 回のみの菌数 (MPN/100g)	
	1 回目	2 回目	1 回目	2 回目
0	$11 \times 10^4$	$46 \times 10^3$	$11 \times 10^4$	$46 \times 10^3$
6	$93 \times 10^2$	$46 \times 10^3$	-	-
24	$93 \times 10^2$	$23 \times 10^2$	$93 \times 10^2$	$24 \times 10^3$
30	$23 \times 10^2$	$90 \times 10^1$	$43 \times 10^2$	$43 \times 10^2$
48	$23 \times 10^2$	$23 \times 10^2$	$93 \times 10^2$	$43 \times 10^2$
54	$90 \times 10^1$	$90 \times 10^1$	$23 \times 10^2$	$93 \times 10^2$
72	$23 \times 10^2$	$40 \times 10^1$	$93 \times 10^2$	$93 \times 10^2$
78	$43 \times 10^2$	$40 \times 10^1$	$93 \times 10^2$	$43 \times 10^2$

\* 菌未接種検体の菌数 1 回目 ( $24 \times 10^3$ 、 $43 \times 10^2$ )、2 回目 ( $<30 \times 10^1$ 、 $<30 \times 10^1$ )

表 2 カンピロバクター汚染鶏肉における凍結 解凍後の菌  
数変化

凍結 回数	カンピロバクター菌数 (MPN/100g)					
	むね肉 1	むね肉 2	むね肉 3	もも肉 1	もも肉 2	もも肉 3
0	$22 \times 10^2$	$23 \times 10^3$	$12 \times 10^3$	$12 \times 10^2$	$12 \times 10^2$	$12 \times 10^2$
1	$45 \times 10^1$	$22 \times 10^2$	$47 \times 10^2$	$45 \times 10^1$	$20 \times 10^1$	$20 \times 10^1$
2	$20 \times 10^1$	$20 \times 10^1$	$35 \times 10^1$	$<15 \times 10^1$	$<15 \times 10^1$	$<15 \times 10^1$

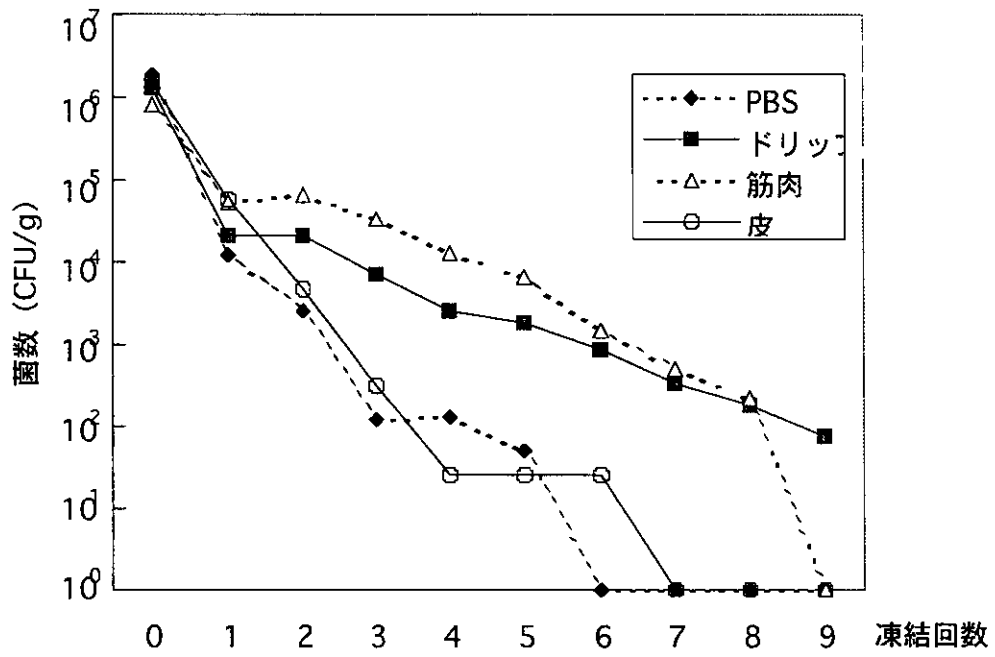


図1 PBS、ドロップ、筋肉乳剤および皮乳剤中*E. coli*の凍結・解凍に対する生残性



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

迅速検査キット「シングルパスカンピロバクター」を用いた鶏糞便からのカンピロバクター直接検出の試み

カンピロバクターが分離される鶏群では，ほとんどの個体が菌を保有しており，糞便中の菌数（平均  $2.5 \times 10^7/g$ ）も多いことが確認されたので，本菌を短時間で検出する検査キット「シングルパスカンピロバクター」を用い，鶏糞便からの本菌の直接検出を試みた。糞便中の大型細菌や夾雑物を減少させつつカンピロバクターを濃縮するために遠心操作を組み合わせた方法を考案し，10 鶏群の糞便検体について検査したところ，1 鶏群以外はカンピロバクターの分離成績と一致

川森文彦 静岡県環境衛生科学研究所  
重茂克彦 岩手大学

#### A 研究目的

カンピロバクターによる食中毒の多くは，本菌に汚染された鶏肉が原因食品となっている。本菌は鶏の腸管内に高率に

生息している菌であり，食鳥処理工程で腸内容物から鶏肉への汚染が引き起こされる。簡便迅速に糞便中のカンピロバクターの有無を識別できれば，食鳥処理場において非汚染鶏群と汚染鶏群の処理順を考慮するなどして，本菌による鶏肉の汚染を減少させることも可能になる。そこで今回は，本来，増菌培養液からカン

ピロバクターを検出するための迅速検査キットである「シングルパスカンピロバクター」(SC, メルク)を用いて、鶏糞便から本菌を直接検出することを試みた。

## B 検査方法

### 1) 鶏糞便からのカンピロバクターの分離およびSC加熱法による検査

県内のA食鳥処理場に搬入された10鶏群について輸送カゴに付着した新鮮便を、鶏群ごとに10検体ずつ採取した。各糞便1gをPBS 9mlで乳剤にし、さらにPBSで10倍階段希釈を行った。各々の乳剤を100 $\mu$ lずつCCDA培地にコンラージ棒で塗抹し、42 $^{\circ}$ Cで48時間、微好気培養後、カンピロバクターの菌数を測定した。分離陽性の場合、1検体当たり2コロニーについてREP-PCRにより遺伝子型別を行い、それぞれの代表株について同定およびPennerの血清群別を実施した。

SCの検査は、それぞれの鶏群の糞便乳剤を10検体ずつプールし、マニュアルに準じて、100 $^{\circ}$ Cで15分間加熱後に160 $\mu$ lをSCのサンプル用の穴に滴下した。判定は、室温に20分間静置した後、テストラインの有無により実施した(図1)。

### 2) 糞便からの直接検出の操作手順の検討

*Campylobacter jejuni*が検出された鶏糞便の10%PBS乳剤について微量用高速遠心機(MC-15A, トミー精工)を用い3,000rpm(1,000 $\times$ G), 5,000rpm(1,900 $\times$ G), 10,000rpm(7,000 $\times$ G)および15,000rpm(15,800 $\times$ G)で1分間および5分間遠心を行い、上清中の*C. jejuni*と大腸菌群の菌数を測定した。

この結果を参考に低速遠心と高速遠心を組み合わせたカンピロバクターの濃縮法を考案するとともに、10%糞便乳剤(*C. jejuni*分離陽性(10<sup>5</sup>/ml)および陰性)を検体として遠心後の再浮遊に用いる希釈液の種類(Bolton Broth, Nutrient Broth No 2, PBS)および加熱(100 $^{\circ}$ C, 15分)の有無がSCの判定に及ぼす影響を検討し、検体の処理方法を試作した。

作成した方法を評価するために10~20%鶏糞便乳剤5検体について原液とSC接種用の再浮遊乳剤中の*C. jejuni*, 大腸菌群および一般生菌の菌数の変化を比較した。

### 3) 考案したSC遠心法による鶏糞便検査

県内のAおよびB食鳥処理場に搬入された10鶏群の輸送カゴ付着糞便(各鶏群5検体をプール)についてSC遠心法を用いて検査を行うとともに、カンピロバクターを分離し、分離菌(各検体2コロニー)について同定および血清群別を行った。

## C 研究結果

### 1) 鶏糞便からのカンピロバクター検出状況およびSC加熱法による検査結果

10鶏群中、カンピロバクターが分離されたのは7鶏群であり、これら鶏群では10検体すべてから本菌が分離された(表1)。陽性鶏群における各検体の菌数は10<sup>3</sup>~10<sup>8</sup>/g台で、10<sup>6</sup>/g台をピークとする一峰性の分布がみられた。分離株はすべて*C. jejuni*であり、5鶏群では単一血清群の菌しか確認されなかったが、残りの2鶏群では3血清群以上の菌が検出された。

SC加熱法の結果は、10鶏群中、偽陽

性が 3 鶏群および偽陰性が 1 鶏群認められ、分離成績との一致率は低かった。

## 2) 鶏糞便からの直接検出法 (SC 遠心法) のプロトコール作成の経緯

遠心操作後の上清中の *C jejuni* と大腸菌群の菌数を調べたところ、両方とも回転数が上がるにつれ菌数は減少する傾向がみられたが、3,000rpm・5 分間遠心では、大腸菌群は 1/10 以下に減少するのに対し、*C jejuni* はわずかな減少にとどまった (図 2)。また、糞便乳剤の希釈液として Bolton Broth 以外の溶液を用いた場合と 100℃加熱を行った場合は、陰性検体でもテストラインが出現し、偽陽性となることが確認された (表 2)。これらの実験結果を基に 3,000rpm の遠心で夾雑物と比較的大型の細菌を減少させた後、15,000rpm の遠心でカンピロバクターを濃縮し、Bolton Broth で再浮遊させる SC 遠心法のプロトコールを図 3 のとおりに作成した。

鶏糞便乳剤 5 検体についてこの方法を実施したところ、*C jejuni* は、平均 46 倍 (24~63 倍) に濃縮されが、大腸菌群と一般生菌は 5 分の 1 以下 (0.19~0.02 倍) に減少することが確認された (図 4)。

## 3) SC 遠心法による鶏糞便検査成績

SC 遠心法により 10 鶏群中、7 鶏群が陽性と判定された (表 3)。カンピロバクターの分離成績と比較すると、No 16 (SC 遠心法陽性、カンピロバクター分離陰性) 以外の鶏群については、SC 遠心法の結果と本菌の分離成績が一致した。

## D 考察

SC は、金コロイド標識抗体を用いた免

疫クロマトグラフィー迅速検査法であり、この方法は、様々な病原体やタンパクの検出キットに応用されている。SC は簡便な方法である反面で、検体中に高濃度のカンピロバクター (検出限界  $10^4 \sim 10^7/\text{ml}$ ) が必要であることと、反応系が多量の雑菌や溶液の性状に影響されやすいという弱点もある。

カンピロバクター汚染鶏群においては、ほとんどの個体が本菌を高濃度に保有していることが確認されたので、糞便からの直接検出が可能と考えたが、SC のマニュアルに準じた加熱のみによる検体処理では、信頼性のある結果は得られなかった。遠心操作を組み合わせることで、小型の細菌であるカンピロバクターを濃縮しつつ他の菌と溶出している阻害物質を減少させることが可能となった。この方法により、ほとんどの検体で分離成績と一致した結果が得られるようになったが偽陽性となったケースが 1 例認められた。この原因は不明であるが、検体中のカンピロバクター以外の菌が反応した可能性も考えられる。

鶏肉は、カンピロバクターの汚染率が高く、公衆衛生上問題となっているが、食鳥処理場での本菌の制御が困難であるのが現状である。SC 遠心法は、培養法に比べ、精度と感度は劣るが、現場検査室での迅速検査が可能であるので、この検出法の導入で処理場内における非汚染鶏群由来鶏肉のカンピロバクター汚染防止に役立てることができる。SC 遠心法はまだ問題点もあるので、今後、検査例数を増やし、さらに検討を重ねていく必要があるものと思われる。

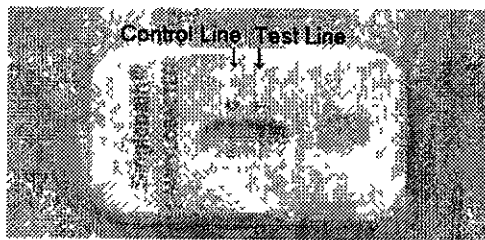


図1 シングルパスカンピロバクター

表1 鶏群ごとの糞便中のカンピロバクター菌数およびSC加熱法による検査結果

鶏群 No	検体数	各糞便検体中のカンピロバクター菌数 (/g)								平均 (/g)	分離株の種類 (Penner血清群)	SC 加熱法
		<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>			
1	10					1	2	4	3	1.1×10 <sup>8</sup>	<i>C. jejuni</i> (G)	+
2	10						5	4	1	1.7×10 <sup>7</sup>	<i>C. jejuni</i> (K)	-
3	10	10								<10 <sup>2</sup>	-	+
4	10					2	4	3	1	2.3×10 <sup>7</sup>	<i>C. jejuni</i> (B)	+
5	10			1	1			7	1	4.1×10 <sup>6</sup>	<i>C. jejuni</i> (C)	+
6	10	10								<10 <sup>2</sup>	-	+
7	10				1	5	4			6.6×10 <sup>6</sup>	<i>C. jejuni</i> (A,F,L,Y)	+
8	10				1		2	7		2.6×10 <sup>6</sup>	<i>C. jejuni</i> (J,T)	+
9	10	10								<10 <sup>2</sup>	-	+
10	10				1	2	5	2		5.2×10 <sup>6</sup>	<i>C. jejuni</i> (E,F,U,T2)	+
計		30	0	1	4	10	29	21	5			