

表2 サルモネラによる集団食中毒事例(2003年, 東京都)

No	発生日	喫食者数	患者数	原因食品 (疑われる食品)	原因施設	血清型	卵の関与	備考
1	3月14日	4	4	不明(赤貝)	家庭	Enteritidis		
2	6月17日	不明	4	(オムレツ 前日調理)	家庭	Enteritidis	有(殻付卵)	
3	7月1日	3	3	生卵添え豚焼肉丼	飲食店	Enteritidis	有(殻付卵)	
4	7月12日	23	22	(マグロのムース)	飲食店	Enteritidis	有(殻付卵)	卵殻(外側)から S Enteritidis検出
5	7月28日	4	1	(家庭の食事)	家庭	London		
6	8月12日	不明	1	不明	不明	Singapore		
7	8月29日	不明	1	不明	不明	Enteritidis		
8	9月20日	30	24	サンドイッチ (パンプキングクリームサンド)	学生寮	Enteritidis	有(殻付卵)	
9	10月16日	不明	1	(錦糸玉子)	不明	Enteritidis	有	
10	12月7日	不明	36	結婚披露宴の食事	結婚式場 (飲食店)	Litchfield		

表3 パーティーでお土産用として提供された「かまぼこ」を原因食品とした  
*S*Enteritidis 事例

発生年月日 2002年4月14日  
発生場所 家庭(1都3県)  
喫食者数 173名  
患者数 123名

事件の経過

4月12日 21時 かまぼこ製造者からパーティー主催者に引き渡される。  
パーティー主催者は営業用冷蔵庫(1℃)に保管  
13日 16時 冷蔵庫から出す  
17時 会場のホテルへ搬入→21時まで常温保存  
18時~21時 会社創立記念パーティー(出席者122名)  
お土産として冷凍ケーキ, かまぼこを配る  
15日~16日 40家族(社員および家族)64名が発症  
19日 18時 細菌検査開始

*S*Enteritidis 陽性検体

患者糞便	49 / 122	(40.2%)
食品 かまぼこ	4 / 4	(100%)
ケーキ	0 / 1	

原因食品 かまぼこ(祝賀用特別注文品, 紅白2本入り)

サルモネラ菌数

かまぼこ(赤)	$2.2 \times 10^9$ cfu/g	} 未開封残品 社員か自宅に持ち帰り冷蔵保存 していたもの
かまぼこ(白)	$2.0 \times 10^9$ cfu/g	
かまぼこ文字部分	$1.3 \sim 1.4 \times 10^2$ cfu/g	

1人あたり50g(かまぼこ約1/5)を喫食したと仮定した時の  
サルモネラ摂取菌数  $1.0 \sim 1.1 \times 10^2$  個

表4 未殺菌液卵の細菌検査成績

	検体数	検出検体数		細菌数(個/g)			大腸菌群数(個/g)					
		サルモネラ	大腸菌	<10 ≤10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup> ≤10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup> ≤10 <sup>5</sup>	(-) <10	10 <sup>2</sup> ≤10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>			
1999年 監視事業	13	0	1	3	3	4	2	1	8	2	2	1
夏季対策	5	0	0	2	1	2						
2000年 監視事業	5	0	0	1	1	3			2		3	
夏季対策	5	1	0	1	1	3			2		3	
2002年 夏季対策	1	0	0	1					1			
計	29	1	1	3	8	7	10	1	12	3	8	1

食品衛生関係事業報告(東京都衛生局)から抜粋

表5 殺菌液卵の細菌検査成績

	検体数	検出検体数		細菌数(個/g)			大腸菌群数(個/g)		
		サルモネラ	大腸菌	<10 ≤10 <sup>2</sup>	≤10 <sup>3</sup> ≤10 <sup>4</sup>	≤10 <sup>5</sup>	(-) <10	≤10 <sup>2</sup> ≤10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>
1999年	6	0	0	3	1	2	5	1	
監視事業 夏季対策	2	0	0		1				
2000年	6	1	0	2	2	2	5	1	
監視事業 夏季対策	6	0	0	2	2	2	5	1	
計	20	1	0	7	6	6	15	3	

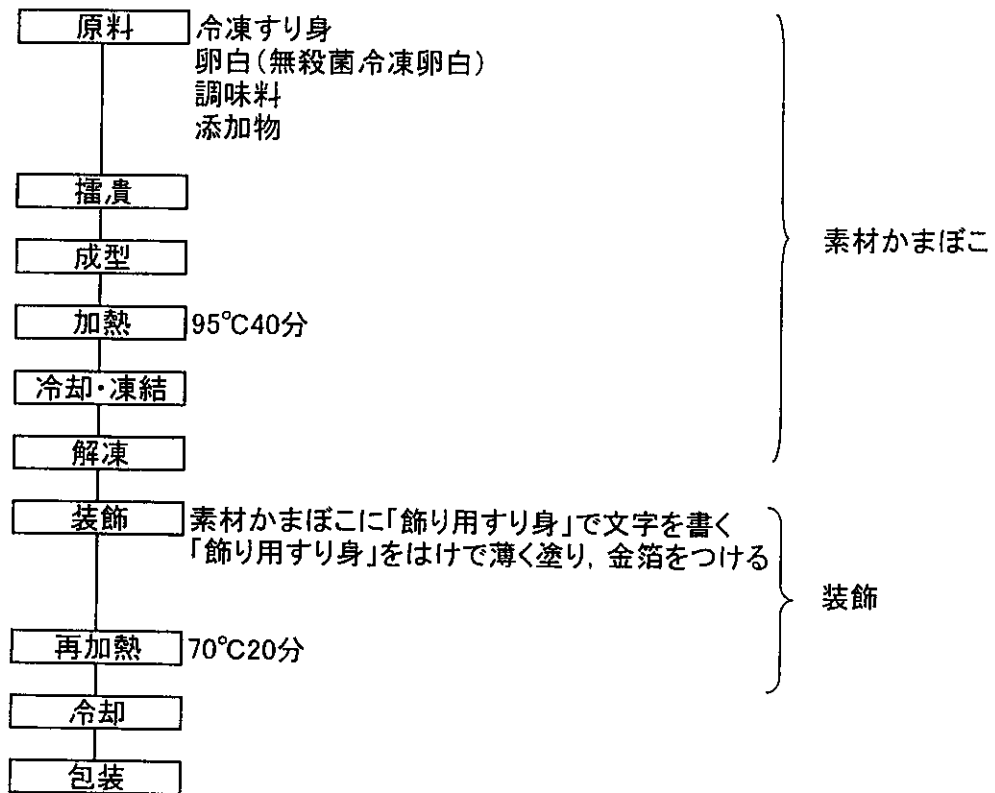
食品衛生関係事業報告(東京都衛生局)から抜粋

表6 未殺菌液卵の細菌検査成績(2004年)

No	検体名	購入店	サルモネラ	大腸菌	黄色ブドウ球菌	細菌数 (個/g)	大腸菌群数 (個/g)
1	全卵	A	—	—	—	$10 \times 10^2$	—
2	全卵	B	—	—	—	$11 \times 10^2$	—
3	全卵	C	—	—	—	$70 \times 10^1$	—
4	卵黄	A	—	—	—	$29 \times 10^2$	$10 \times 10^1$
5	卵黄	C	—	—	—	$40 \times 10^1$	—
6	卵白	A	—	—	—	$78 \times 10^2$	—
7	卵白	C	—	—	—	$56 \times 10^3$	$25 \times 10^2$

検体購入日 2004年1月10日

図1 紅白かまぼこの製造過程 \*



かまぼこの材料に「無殺菌冷凍卵白」が使用されていた  
「飾り用すり身」に使用された「無殺菌冷凍卵白」の別ロットからも *S. Enteritidis* が検出された

\* 秋山倫子 食衛誌, 44(2), J-200, 2003

°C 35

— 16リットル缶  
— 10リットル缶

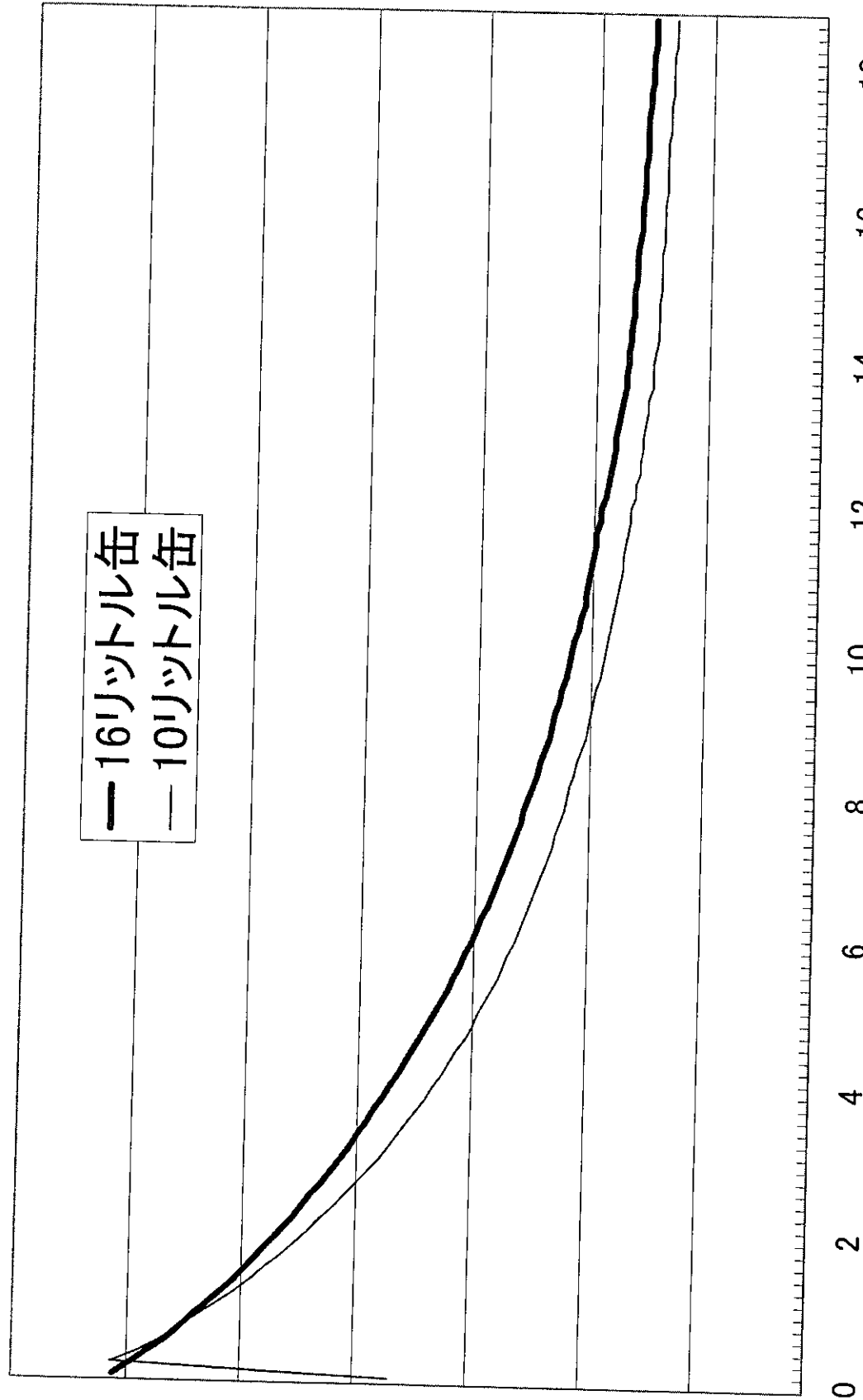


図2 液卵を4°Cで保存した時の温度変化(1回目) 時間

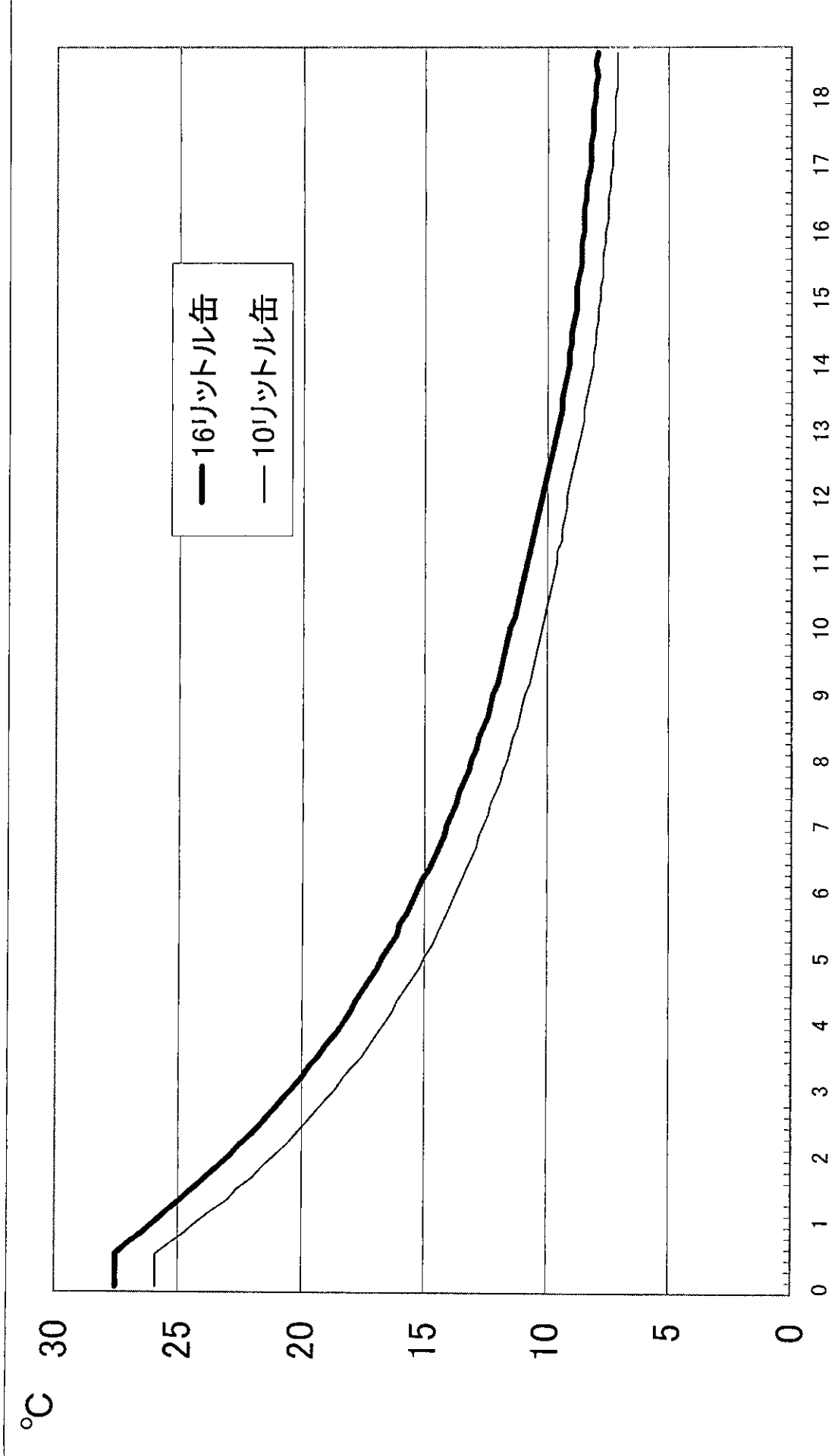


図3 液卵を4°Cで保存した時の温度変化(2回目)



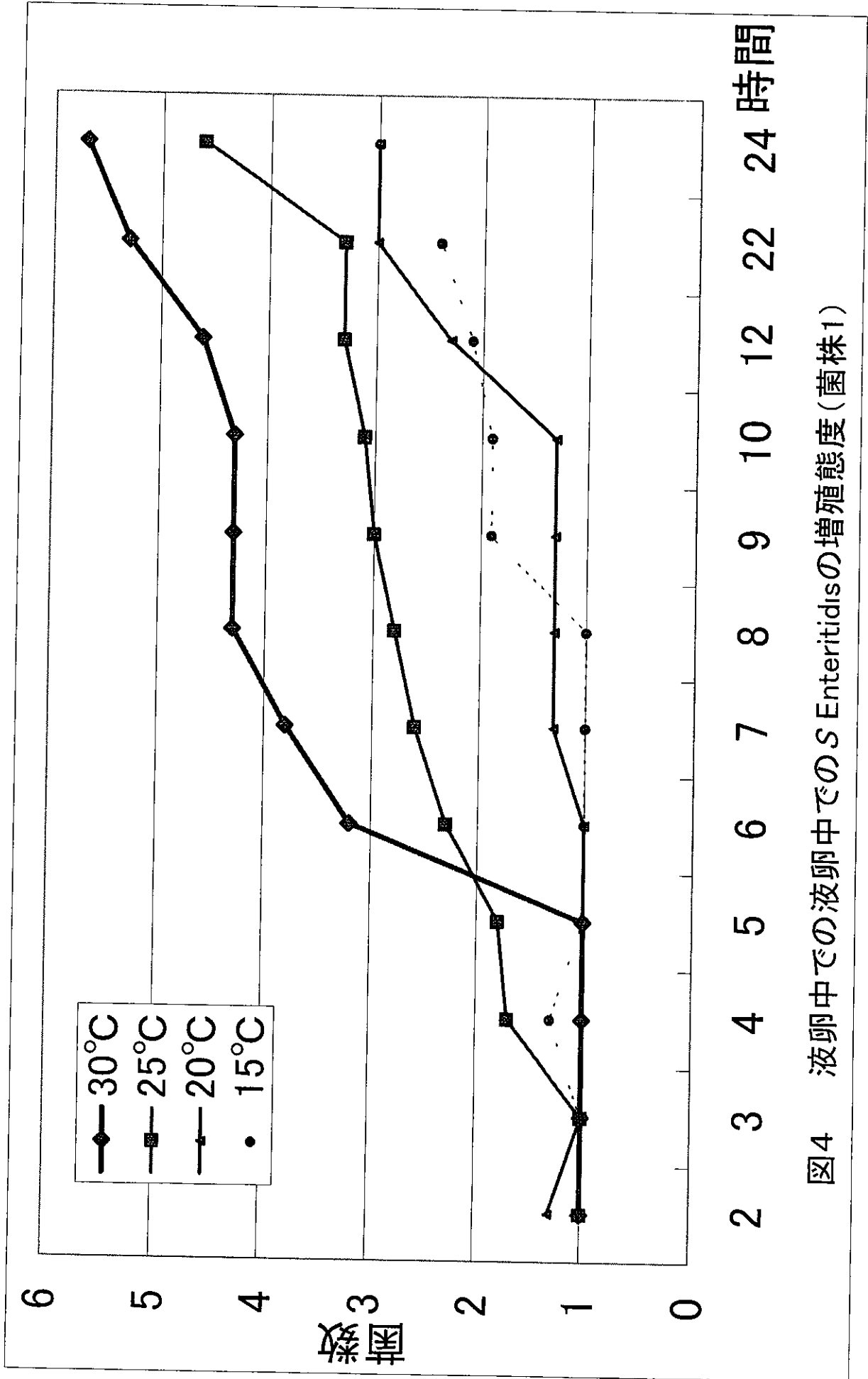


図4 液卵中での液卵中での *S. Enteritidis* の増殖態度 (菌株1)

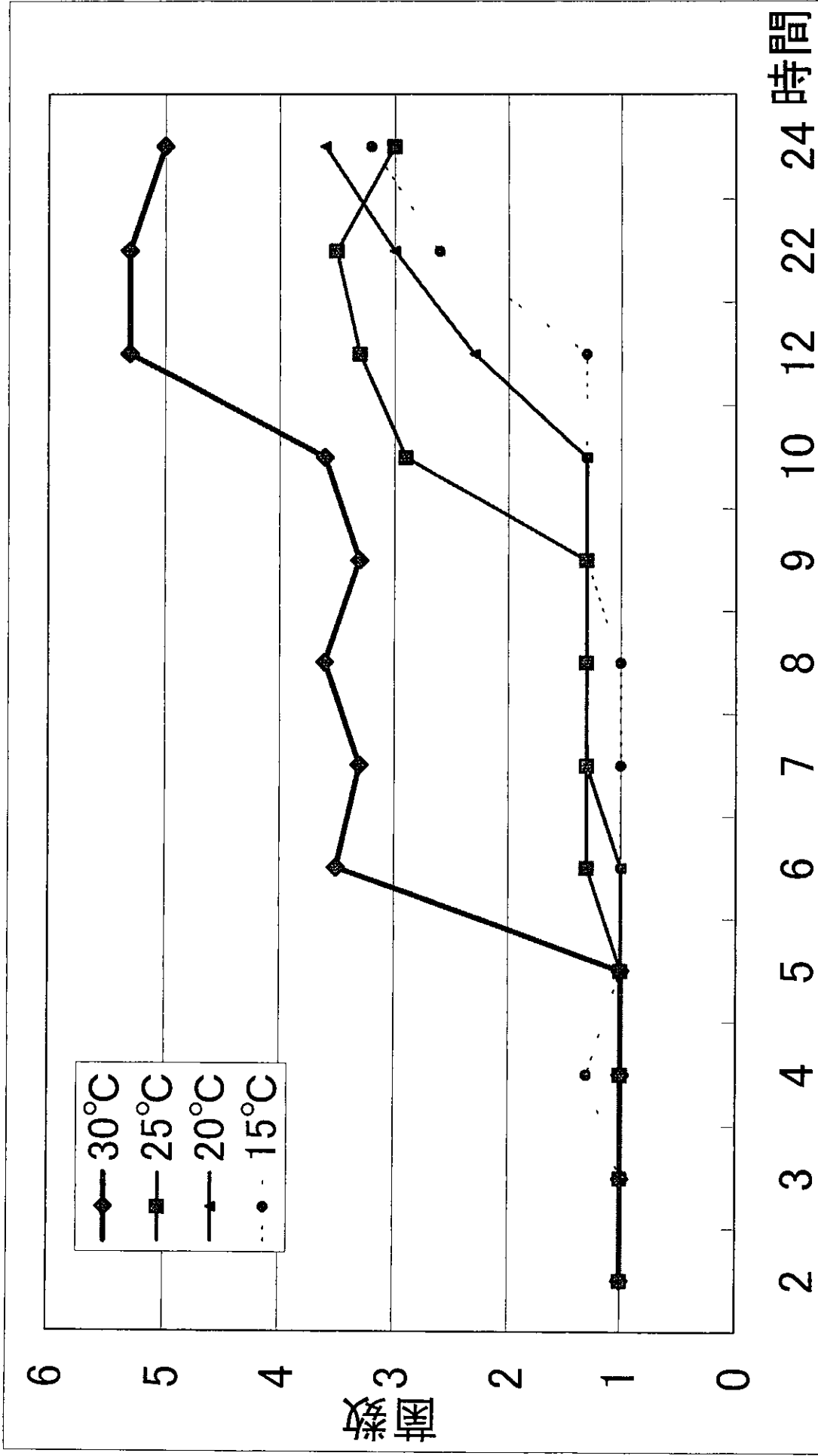


図5 液卵中でのS.Enteritidisの増殖態度(菌株2)

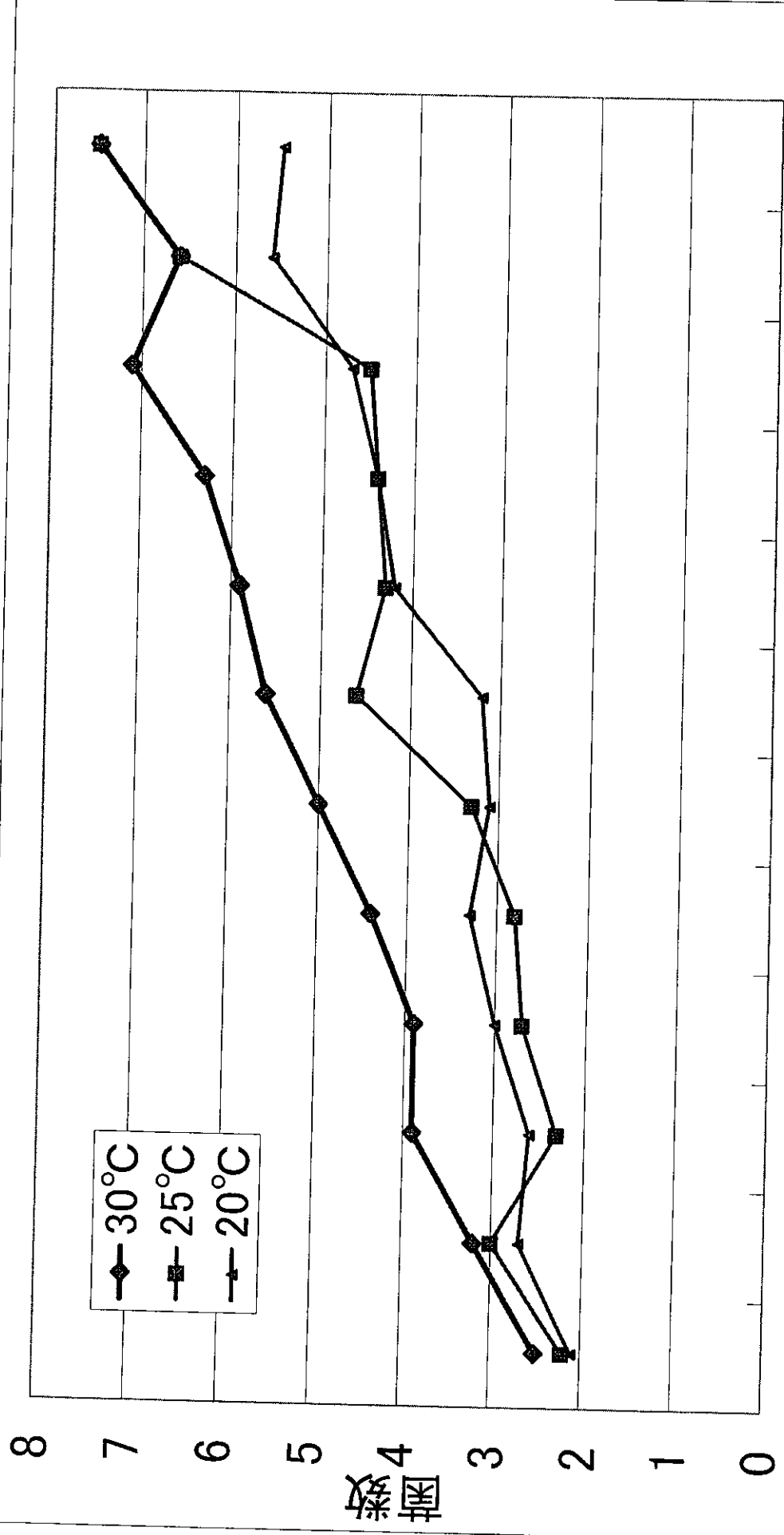


図6 液卵中でのE.coliの増殖態度(菌株3)

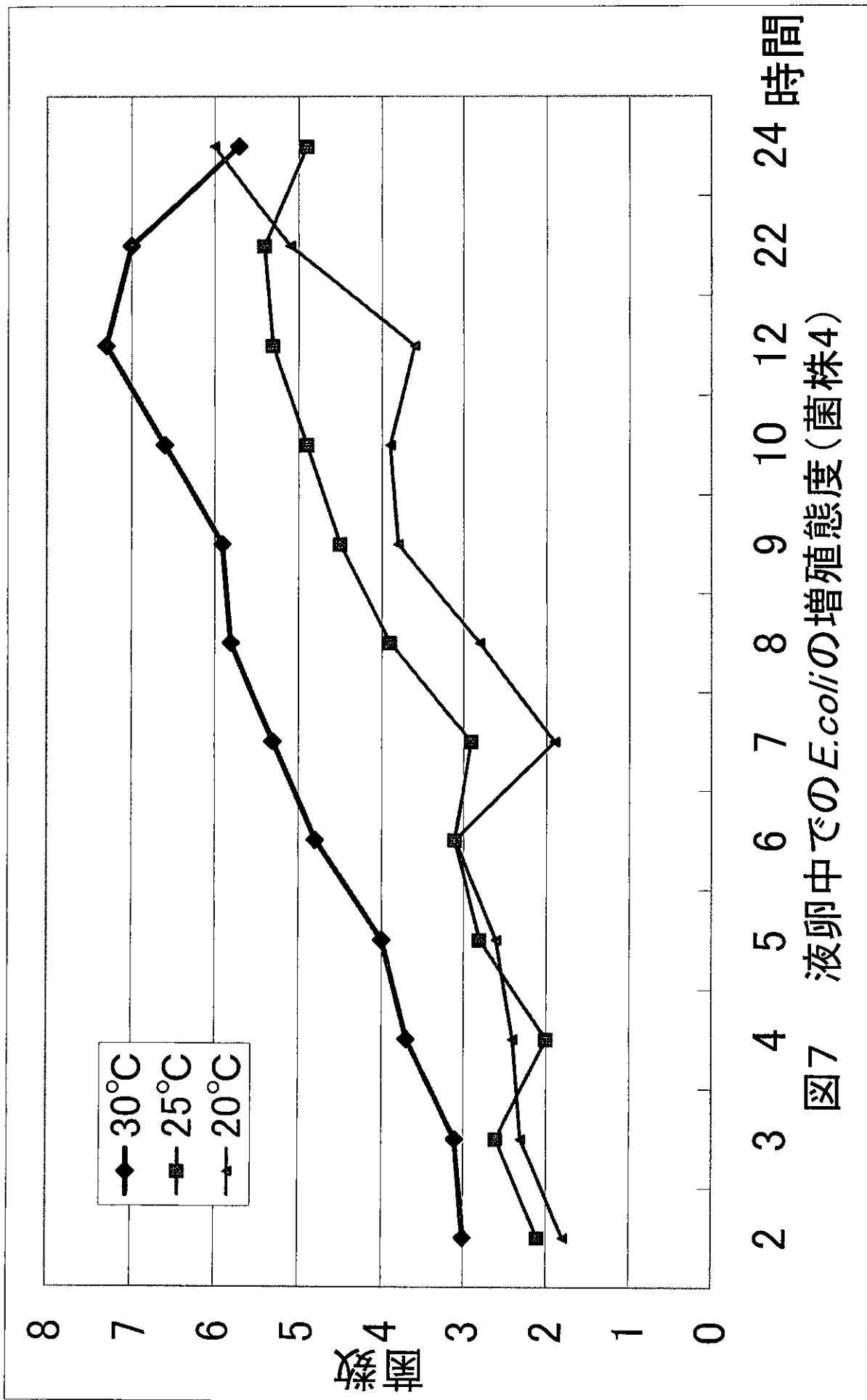


図7 液卵中での *E. coli* の増殖態度 (菌株4)



写真1 かまぼこを原因とした*S. Enteritidis*食中毒事例(原因食品)  
2002年4月

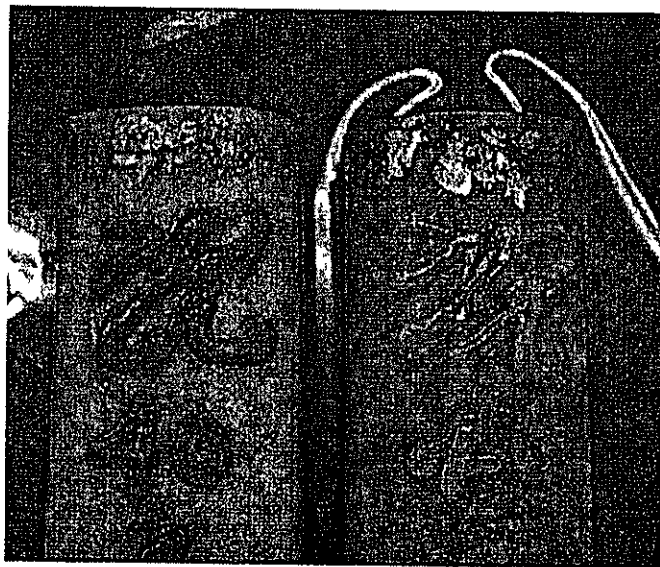


写真2 かまぼこを原因とした*S. Enteritidis*食中毒事例(原因食品)  
2002年4月

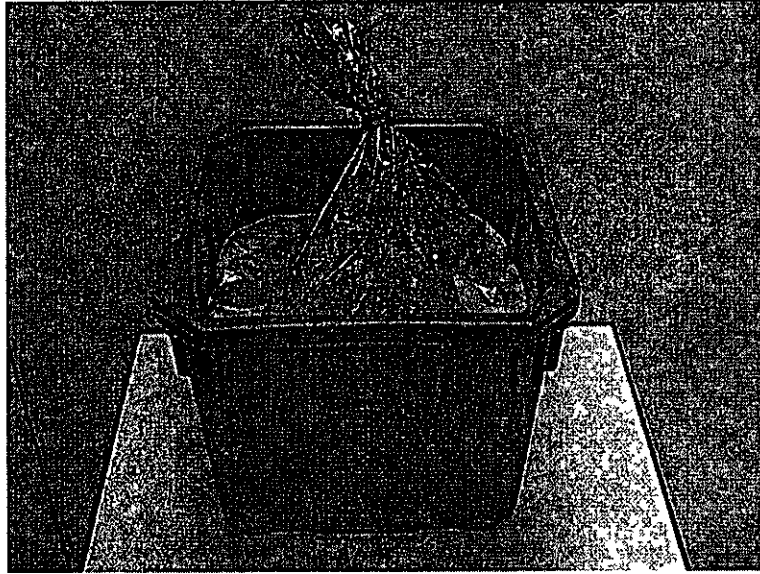


写真3 液卵 合成樹脂容器 10L入り

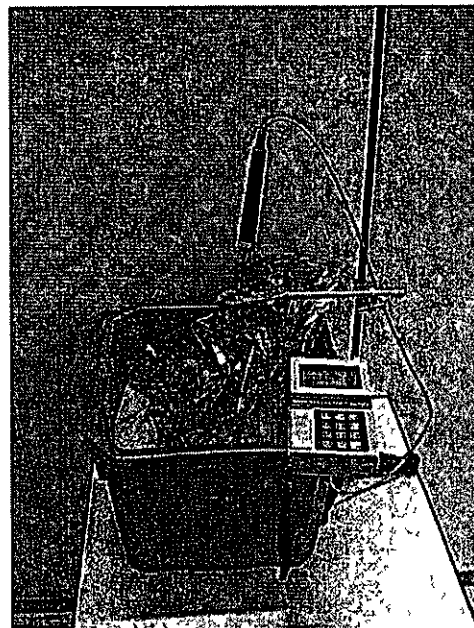


写真4  
温度測定方法①

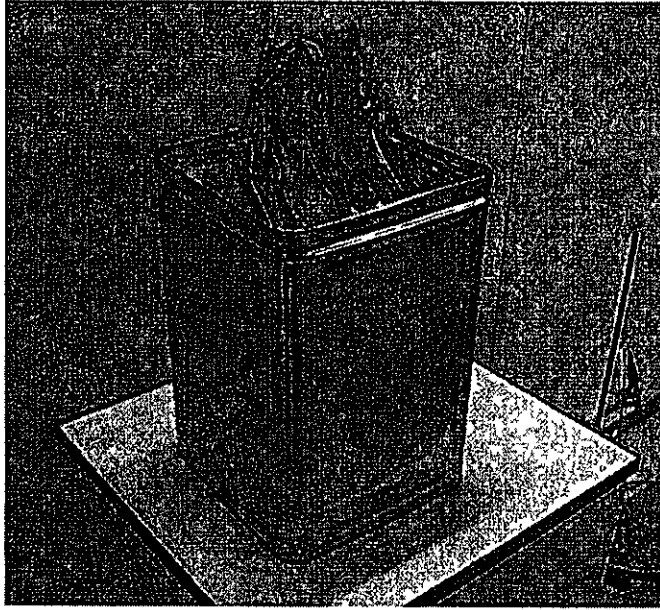


写真5 液卵 スチール缶容器 16L入り

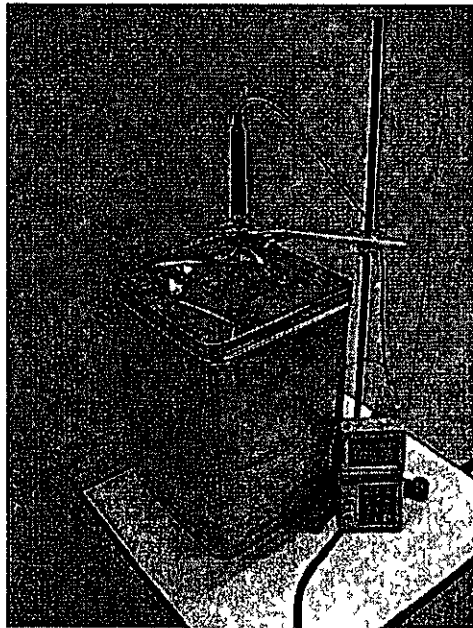


写真6  
温度測定方法②

## II. 分担研究報告書

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）



平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)

分担研究報告書

牛の肝臓等における *Campylobacter* 属菌汚染状況に関する研究

分担研究者 沓木 力晴 大阪市食肉衛生検査所長

研究要旨

- ①胆嚢内胆汁(胆汁)には、*Campylobacter* 属菌の増殖作用があることが分かった。しかしながら、減衰するものもあり、その違いは競合作用が考えられる一般生菌数の存在以外は見いだせなかった。
- ②胆汁と消化管からの *Campylobacter* 属菌分離状況結果より、牛生体内 *Campylobacter* 属菌の起源は消化管であり、これに胆汁での増殖作用が加わっているものと推察できた。
- ③肝臓表面の二次汚染防止策として、解体ラインをフックラインにする方法かハノト コンヘアラインに比べて効果的であることが分かった。
- ④肝臓加工処理の前に電解水等で浸漬することによって優れた除菌効果が得られることが分かった。
- ⑤ *Campylobacter* 属菌は好気条件下では死滅していくはずであるが、冷蔵流通条件下(4℃)では、最低 10 日以上も肝臓または胆汁中で生残していることが示唆された。
- ⑥実質汚染対策は不可抗力であるが、簡易同定キットを応用(胆汁検査)することにより、従来最低 4 日を要した本菌同定日数を約 1 時間で胆汁中  $10^4$ cfu/mL 程度の感度で判定可能であることから、日常の衛生管理に有効と考えられた。

研究協力機関 大阪市食肉衛生検査所(沓木力晴、前原智史、中本成彦)、青森県十和田食肉衛生検査所(桜庭 恵)群馬中央食肉衛生検査所(福田二三男、高橋敏子)、埼玉県中央食肉衛生検査センター(大塚孝康)、東京都芝浦食肉衛生検査所(高田菜穂子)、神奈川県食肉衛生検査所(小林由紀)、新潟県食肉衛生検査センター(原 智之)、三重県四日市食肉衛生検査所(千田明郎)、鳥取県食肉衛生検査所(井田正己)、宮崎県都城食肉衛生検査所(坊菌慶信、久保明子)

## A 研究目的

平成 14 年の食中毒統計によると、病因物質別の事件数は、*Campylobacter* 属菌によるものか、420 件でサルモネラ属菌(425 件)に次いで第二位であり、平成 9 年以降事件数ではサルモネラ属菌、腸炎ヒフリオと並び毎年上位に挙げられている。この傾向はわか国に限らず、世界各

国で増加傾向を示している。これは単に検査技術が向上したためとは考えられない。さらに、近年本菌のキノロン系薬剤に対する耐性獲得の増加や本症の合併症として麻痺を伴う Guillain-Barre 症候群や Miller-Fischer 症候群との関連が問題となっており、本感染症の重要性を改めて認識するとともに、その防除策を講じることが急務となっている。

*Campylobacter* 属菌による食中毒原因食品としては、鶏肉やその加工品が多いとされるが、牛の生レバーや牛肉の摂取が原因と考えられる事例も少なくなく、DNA パターンの調査で鶏由来株より牛由来株の方が人由来株に近似していたという報告もある。また、本菌が鶏等の家禽類や牛、羊などの家畜に高率に保菌されていることもよく知られている。

平成 14 年度の当研究班報告によると、牛肝臓における *Campylobacter* 属菌汚染実態は肝臓の部位により差が見られ、肝管の分布により検出率が違うことが分かった。汚染菌量も平均で 2 乗オーダー/10g と高く、胆嚢内胆汁（胆汁）においては、4 乗オーダー/10g であった。肝臓の本菌による汚染源は胆汁で、そこで増殖したものか肝管を逆行して汚染していることが示唆された。牛肝臓は 1 割程度の本菌汚染があり、解体処理工程で 2 割 5 分の汚染が認められた胆汁から清浄肝臓への二次汚染をどうやって防ぐかが今後の課題とされた。

そこで、今研究では、①消化管→胆汁→肝臓という *Campylobacter* 属菌汚染ルートの証明方法の一つとして、*C. jejuni* 添加による胆汁での増殖試験（37℃）および牛生体内肝臓での本菌の増殖態度を調べる *in vitro* での *C. jejuni* 添加試験（37℃）②同一牛における胆汁および消化管（十二指腸 直腸）内 *Campylobacter* 属菌分離状況等と定量試験、③各種解体ライン（オンフック、ハットコンヘアライン）での解体処理中における肝臓表面の本菌汚染実態と胆汁汚染の関係調査、④同様に流通前の肝臓二次汚染実態と消毒 殺菌剤を用いた効果的な除菌方法の検討、⑤牛肝臓の冷蔵流通（4℃）段階でのリスクを推測するための胆汁および肝臓への *C. jejuni* 添加による生残性試験⑥本菌で実質汚染した肝臓を流通する前に検出する試みとして、簡易迅速判定キット（Single Path® CAMPYLOBACTER MERCK）の感度試験と応用法の研究、以上 6 項目について調査研究を実施した。

## B 研究方法

### 1 牛胆汁および肝臓中における *C. jejuni* の増殖性試験

#### 1) 牛胆汁における *C. jejuni* の 37℃増殖性試験

調査期間および調査対象

平成 15 年 2 月から 6 月に各と畜場とと殺解体された牛 74 頭の胆汁。

実施方法

(1) 胆汁由来の *C. jejuni* 株を試験菌株とし、Preston 培地【Nutrient Broth No 2 に Preston Selective Supplement と *Campylobacter* Groth Supplement (Oxoid) を添加し、5%量の馬無菌脱繊維血液を加えた】に添加し、37℃ 微好気 18~24 時間増菌培養した後、増菌液を 2500rpm 15 分遠心分離し、上清除去後、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）で 1mL あたり  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$  個になるように調整し、接種菌液とした。各接種菌液を CCDA 培地【*Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base に CCDA Selective Supplement を添加した】に塗抹し、37℃微好気で 48 時間培養し、調整の状況を確認した。

(2) 各と畜場とと殺解体された牛の胆汁を無菌的に採取し、この胆汁の pH を測定し、1mL を AC プレート（3M）にて一般生菌数を測定した。

(3) 採取した胆汁は、接種試験と平行して定性試験（胆汁 1mL を Preston 培地 10mL 42℃微好気で 24 時間培養後、CCDA 培地 42℃微好気で 48 時間分離培養）を行い、*Campylobacter* 属菌が検出された胆汁については、菌接種試験を中止した。

(4) 採取した胆汁 10mL にそれぞれの接種菌液 0.1mL を接種し、42℃微好気で培養し、1日ごとに 7 日目まで毎回、PBS による胆汁の希釈系列を作製し、CCDA 培地に各希

釈液を0.1mL塗抹し、菌数を測定した。

## 2) 肝臓における *C. jejuni* の37°C増殖試験 調査期間および調査対象

平成15年2月から3月に各と畜場でと殺  
解体された牛3頭の肝臓

### 実施方法

(1) 胆汁由来の *C. jejuni* 株を試験菌株  
とし、Brain Heart Infusion Broth 10mL  
に接種し、42°Cで24時間培養した。

(2) 牛肝臓をと畜場で採材し、ストマノ  
カー袋（オルガノ製フィルターなし  
400mL用）に、肝臓10g（包膜は含まず、  
極力立方体になるように）を入れたもの  
を18個無菌的に作製した。作製した肝  
臓3個について、*Campylobacter* 属菌の  
有無を調べた（Preston 培地、CCDA 培地  
使用）。また、検査に使用した肝臓の胆  
汁について、*Campylobacter* 属菌の有無  
を調べた（胆汁10mL+Preston 培地90mL、  
CCDA 培地使用）。これらの結果が  
*Campylobacter* 属菌陽性であれば、以降  
の試験は無効とした。残りの15個の肝  
臓は4°Cで保存した。

(3) BHI で増菌した菌液を PBS で希釈し  
て  $5.0 \times 10^4$  cfu/mL の *C. jejuni* 菌液を作  
製し、添加菌液とした。この添加菌液  
0.1mL を前日作製したストマノカー袋に  
入った肝臓の上部表面に添加し試料とし  
た。試料は14検体作製した。残りの肝  
臓1個を用いて、一般性菌数および大腸  
菌群数を定法により測定した。試料を好  
気下および微好気下にて7検体ずつ37°C  
で保存した。

(4) 試料作成4時間、8時間、12時間、  
24時間および48時間後 PBS90mL を試料  
に加え、できる限り手で細かく砕き、ス  
トマノカーで20秒間ホモシナイスした。  
好気 微好気それぞれ1検体ずつ実施し  
た。これを PBS によって10倍段階希釈  
系列を作製し、その0.1mL を CCDA 培地

に塗抹した。CCDA 培地による分離培養  
は、すべて42°C微好気にて48時間培養後  
に判定した。

## 2 牛胆汁と消化管内の *Campylobacter* 属菌 分離状況

### 1) 牛胆汁および直腸便中の *Campylobacter* 属菌保菌状況

#### 実施期間および調査対象

平成15年11月にと畜場に搬入され解体さ  
れた牛20頭の胆汁および直腸便。

#### 実施方法

同一牛の胆汁および直腸便を無菌的に採取  
し、各々10g を Preston 培地100mL に接種し、  
以下平成14年度実施要領に従って、定性試  
験を実施した。

### 2) 牛胆汁および十二指腸中の *Campylobacter* 属菌保菌状況

#### 実施期間および調査対象

平成15年11月から平成16年1月にと畜  
場に搬入され解体された牛30頭の胆汁およ  
び十二指腸内容物。

#### 実施方法

同一牛の胆汁および十二指腸内容物を無菌  
的に採取し、各々10g を Preston 培地100mL  
に接種（10g 以上採材できなかった場合は、  
採取した量の十倍量の Preston 培地に接種）  
し、以下平成14年度実施要領に従って、定  
性および定量試験（MPN3 本法）を実施した。

## 3 各種解体ライン（オンフック、パツ トコンペライン）での解体処理中 における肝臓表面の *Campylobacter* 属菌汚 染実態と胆汁汚染の関係調査

#### 調査期間および調査対象

平成15年4月から16年2月に各と畜場  
でと殺解体された牛178頭の牛胆汁および  
肝臓（胆嚢除去部）表面100cm<sup>2</sup> のふき取

り材料（ふきふきチェノク 栄研器材）について、*Campylobacter* 属菌の検査を行った。ライン構造上の違いにより、各施設での採材する箇所を図1に示す。

#### 実施方法

- 1) 定性検査 胆汁 1mL を Preston 培地 10mL に接種した。肝臓のふき取り材料はふき取り液 5mL に 2 倍量 Preston 培地 5mL に接種した。以下平成 14 年度実施要領に従って、定性試験を実施し、*Campylobacter* 属菌を同定した。
- 2) 定量検査（直接平板塗抹法） 試料原液および 10 段階希釈液 0.1mL を CCDA 培地に塗抹し、42℃ 微好気にて 48 時間培養し、培地上の疑わしい集落数を計測して、形態学および生化学的検査により同定した。

#### 4. 流通前の肝臓二次汚染実態と消毒・殺菌剤を用いた効果的な除菌方法の検討

##### 調査期間および調査対象

平成 15 年 8 月から 10 月にと畜場でと殺解体された牛 90 頭の肝臓

##### 実施方法

胆嚢除去後の牛肝臓臓側面を滅菌湿潤カーセ（付着菌数測定用成形カーセ 沢田棉行）にてふき取り検査を実施した。ふき取り後、各消毒剤【次亜塩素酸ナトリウム（次亜 Na, 100ppm 和光純薬）、アルコール製剤（アルコール、花王ワイトスキッシュ® 花王）、強酸性電解水（電解水、ホシサキ電気 ROX-20TA により用時調製）】を検体に噴霧し、30 秒後に再びふき取り検査を実施した。対照群として、水道ホースを用いて表面の流水洗浄を行い、臓側面のふき取りを実施した。また、噴霧の他に水道水および電解水の 30 秒間の浸漬を行った。ふき取ったカーセは PBS で 10 段階希釈系列を作製し、希釈試料液をペトリ

フィルム法（3M）にて一般生菌数および大腸菌群数を測定するとともに、CCDA 培地に 0.1mL ずつ接種し、42℃ 微好気にて 24 時間培養し、発育した集落を定法にて *Campylobacter* 属菌の同定を行うとともに菌数を定量した。

#### 5 牛肝臓の冷蔵流通（4℃）段階でのリスクを推測するための胆汁および肝臓への *C. jejuni* 添加による生残性試験

- 1) 胆汁における *C. jejuni* の 4℃ 生残性試験

##### 調査期間および調査対象

平成 15 年 11 月から 12 月にと畜場でと殺解体された牛 9 頭の胆汁。

##### 実施方法

- (1) 胆汁由来の *C. jejuni* 株を試験菌株とし、Preston 培地に接種し、37℃ 微好気 18～24 時間増菌培養した後、増菌液を 2500rpm 15 分遠心分離し、上清除去後、PBS で McFarland 4 の濃度に調製し、接種菌液とした。10 段階希釈系列を作製し、CCDA 培地に塗抹し、接種菌数を計測した。
  - (2) と殺解体された牛の胆汁を無菌的に採取した。原液 1mL を 9mL Preston 培地に接種し、42℃ 微好気にて 24 時間増菌培養後 0.1mL を CCDA 培地に塗抹し、42℃ 微好気にて 48 時間培養後、*Campylobacter* 属菌が確認されたものについては実験を中止した。
  - (3) 胆汁 18mL に調製菌液 2mL を接種し、4℃ 微好気にて保存し、接種後 0 時間、4 時間、24 時間、48 時間、72 時間、10 日後について、試料を 10 段階希釈して各系列を作製し、CCDA 培地に各 0.1mL 塗抹し、菌数を測定した。
- 2) 肝臓における *C. jejuni* の 4℃ 生残性試験