

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安心・安全確保推進研究事業

食品製造における食中毒菌汚染防止  
のための高度衛生管理に関する研究

平成 19-21 年度 総合研究報告書

主任研究者 品川邦汎

平成 22 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成 19-21 年度総合研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

食品製造における食中毒菌汚染防止のための高度衛生管理に関する研究

食肉（豚肉）、果実・野菜・漬け物類、および ready to eat 食品を対象食品とし、その有害微生物のコントロール手法を確立するために各製造工程における危害分析を行い、最終的には安全な食品（食肉）製造における HACCP モデルを作成すること、また衛生管理に必要な食中毒菌のモニタリング手法を確立することを目的とし、以下の研究を行った。

1. と畜場における食肉（豚）製造のための高度衛生管理に関する研究
2. 果実・野菜・漬け物等における食中毒菌の衛生管理に関する研究
3. 衛生管理における食中毒菌のモニタリングに関する研究

分担研究者

牧野壮一 帯広畜産大学  
五十君静信 国立医薬品食品衛生  
研究所

A. 研究目的

近年、各種食品製造施設において、食品の安全性確保についてより一層の向上を図るため、危害分析重要管理点方式（HACCP）を導入した衛生管理システムの構築が進められている。HACCP 導入にあたっては、対象食品について発生しうる危害を科学的データに基づいて評価し、原料の搬入から製品となる製造の各段階で発生する危害を分析し、その管理手法を確立することが重要である。

本研究では、食肉（豚肉）、果実・野菜・漬け物類、および ready to eat 食品を対象食品とし、各製造工程における危害分析を行い、その有害微生物のコントロール手法とモニタリング手法を確立するとともに、安全な食品（食

肉）製造における HACCP モデルを作成する。

これまで食肉生産における高度衛生管理の確立に向けて、と畜場での牛解体処理における腸管出血性大腸菌 0157 などの有害微生物汚染防止のため、HACCP 方式について検討を行ってきた。本研究では、豚の解体処理工程における微生物汚染と危害発生として、サルモネラ属菌を対象に汚染実態と処理工程での汚染動態を解明し、これらの有害微生物のコントロール手法を確立すると共に、安全な食肉製造のための高度衛生管理として HACCP モデルを作成することを目的とした。

また、果実・野菜（野菜サラダ等）・漬け物等の製造過程における微生物危害発生防止方策として HACCP モデルプランの構築を目的に、各製造過程における微生物学的危害について実態調査を実施する。また、環境中での微生物の生残性（ストレス抵抗性）、増殖性等を調査し、食品の製造工程及び保存条件などについて

HACCP モデルの構築をすすめた。

ready to eat 食品等に汚染が認められるリステリア・モノサイトゲネスは、その製造工程においてバイオフィルムを形成しており、これが本菌の食品への汚染原因となっていることが指摘されている。本菌は乾燥や高濃度の食塩耐性、低温増殖性といった環境抵抗性を示し、バイオフィルム形成が見られる。そこで、本研究ではリステリアの食品製造工程における衛生管理に適したモニタリング方法を確立し、食品製造工程や保存における増殖性の評価を行うと共に、バイオフィルムの形成防止と本菌の除去を目指した管理法を検討することを目的とした。

さらに、カンピロバクターは微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊な培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、食品における本菌の汚染を調べることは困難であった。以前の検討から通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。そこで、コラボレイティブスタディにより、ストマッカー袋を用いた簡易試験方法の妥当性を検証した。

## B. と畜場における食肉（豚）製造のための高度衛生管理に関する研究

近年、各種食品製造施設において、より一層の衛生管理水準の向上を図るため HACCP 方式を基本とする衛生管理手法の構築が進められているが、豚肉の処理については十分な検討がなされていなかった。平成 19 年度および 20 年度は、豚肉における危害微生物の同定とその汚染実態把握を目的として調査を進めた。

平成 19 年 10 月から平成 20 年 11 月に欠けて、北海道、岩手、宮城、秋田、群馬、新潟、静岡、三重、兵庫、鳥取、愛媛、鹿児島、沖縄の食肉処理場に搬入された豚を対象とし、豚盲腸便（1130 農場、3484 頭）および外皮ふき取り（67 農場、305 頭）、枝肉ふき取り（272 農場、738 頭）検体から分離し、TSI 培地、LIM 培地で性状確認し、さらにサルモネラ型別用免疫血清 0 多価、01 多価の凝集が確認された株を検査に供した。供試株数は表 1 に示すとおり、血清型別検査に 2254 株、そのうち 629 株を薬剤感受性試験に供した。

豚盲腸便からのサルモネラ分離状況を表 2（月別）、表 3（機関別）に示す。検査頭数 3484 頭中 413 頭（11.9%）からサルモネラが検出され、陽性の豚が認められた農場は 1130 農場中 238 農場（21.1%）であった。月別の分離状況は検査数が少なかった平成 19 年 10 月と平成 20 年 11 月を除くと平成 20 年 8 月が最も陽性率が高かったが、顕著な季節的変動は認められなかった。機関別の分離状況は農場陽性率で 6.3～64.7%、頭数陽性率で 2.1～38.1%と食肉衛生検査所により異なり、地域差が認められた。

同じ農場の検体から分離された同じ血清型の複数の株について 1 農場当たり 1 株として集計した結果を表 4 に示した。盲腸便由来株は 34 種類の血清型に型別された。分離血清型は *S. Typhimurium* が最も多く、次いで *S. Derby*、*S. Infantis*、*S. Agona* が多かった。これらの主要菌型は分離した食肉衛生検査所の機関数も多かったが、1 機関のみで検出された血清型も 18 種類認められた。

同一農場における複数の血清型の分離状況は表 5 に示した。同じ検査日に同一農場で 2 種類の血清型が分離された例は 24、3 種類の血清

型が分離された例は1であった。また、陽性農場のうち複数回の検査を実施した95農場中47農場が複数回で陽性が認められたが、48農場は1回のみ陽性であった(表6)。少数であるが、継続して同じ血清型が分離された農場も存在し、当該農場ではサルモネラが定着していると考えられた。複数の種類の培地から鈎菌された株であっても同一個体由来の株は同じ血清型である場合がほとんどであったが、同一個体から2種類の血清型が分離された例が9検体あった(表7)。

外皮のふき取りは67農場、305頭の肛門周囲、腹部について実施したところ、肛門周囲の検査頭数陽性率が13.8%、腹部が17.7%と盲腸便の陽性率(11.9%)よりやや高かった(表8)。また、外皮ふき取り由来株と盲腸便由来株の血清型の一致性を表9に示した。同じ個体の検査で外皮および盲腸便の両者が分離陽性であった検体において、肛門周囲ふき取りで15/17、腹部ふき取りで17/20と分離株の血清型が一致したものが多かった。同じ個体は検査していないがサルモネラが陽性であった農場の検体においての外皮ふき取りから分離された株も肛門周囲ふき取り14/15、腹部ふき取り13/19と当該農場の豚盲腸便由来株の血清型と一致したものが多かった。これらのことから、繋留時の接触などにより豚糞便中のサルモネラの外皮への汚染が広がっているものと考えられた。ふき取り材料から分離された血清型は14種であり、そのうち12種類は盲腸便から検出されている型であった。S. Typhimuriumが最も多く、S. Derby、S. AgonaとS. Infantisなどが主要な型であった(表11)。

本調査で豚から分離された血清型のうち7種類、分離数が多かったS. Typhimurium、S. Infantis、

S. Agona および O4:i:-、S. Schwarzengrund、S. Saintpaul、S. Newport は平成19~20年のヒト由来株の集計の上位15サルモネラ血清型(国立感染症研究所感染症情報センター 病原検出情報)に該当する型であった。S. Derby は平成19~20年の上位15には含まれていなかったが、平成17年の集計ではヒト由来株の上位であった。これらのことから、豚のサルモネラ汚染が、ヒトの健康被害の一因となっている可能性が示唆された。

盲腸便およびふき取り由来株を合わせた主要菌型の12薬剤に対する薬剤感受性を表12に示した。S. Typhimurium の84.3%、S. Choleraesuis (Kunzendorf 生物型も含む)の95%は供試薬剤のいずれかに耐性を示した。一方、S. Agona の82.9%、S. Derby の76.5%は感受性株であり、血清型により耐性株の割合が異なっていた。S. Infantis は27.3%が耐性株であり、その全てが複数の薬剤に耐性を示した。さらにCFXに耐性であった株は $bla_{CMY-2}$ 遺伝子を保有しており、プラスミド性 AmpC (セフォキシチン等のセファマイシン系を筆頭とする多くのβ-ラクタム剤を加水分解する、プラスミドにコードされたβ-ラクタマーゼの1種のセファロsporinナーゼ) 産生株と考えられた。プラスミドの伝播によるCMY-2遺伝子保有株の浸淫拡大が欧米ではすでに問題となっており、国内でも今後の増加が懸念される。FOM 誘導耐性の株が S. Agona、S. Choleraesuis Kunzendorf 生物型、S. Miyazaki に認められた。FOM は治療に汎用されることから、FOM 耐性株についてはヒト由来株との関連を含め豚の保菌や市販食肉汚染の動向には注意が必要と考えられた。

近年多剤耐性の S. Typhimurium DT104 (ファ

ージ型別法で definitive type 104 に分類) の増加が大きな問題となっている。S. Typhimurium DT104 はペニシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、サルファ剤等の各種の抗菌薬に耐性のことが多く、欧米ではキノロン薬にも耐性を獲得した株が確認されている。表 13、14 に示すように、今回の調査では S. Typhimurium 分離株の 45.6% が DT104 であることが確認されたが、食肉衛生検査所により DT104 の占める割合は異なっていた。また DT104 と確認された株は SM、CP、TC、G、ABPC の 5 薬剤にすべて耐性を示した。

本調査により、地域差はあるものの全国的にサルモネラ汚染農場が存在することが明らかとなった。分離株の血清型は多岐に渡り、ヒト由来主要菌型と同じ型も認められ、血清型によって高度な薬剤耐性を保有していたことから、豚処理施設においてこのような危害微生物を制御する高度な衛生管理を確立する必要性が示唆された。豚のと畜処理は工程数が多く作業内容も複雑であることから、微生物危害を受けやすい工程を特定しその工程について危害防止措置を適切に講じる必要がある。

そこで 21 年度は、豚と畜処理における HACCP 方式を基にした高度衛生管理について、共同研究機関が調査した豚の解体・処理工程ごとの微生物汚染およびその制御等に関する実態調査結果から、微生物による汚染要因および汚染除去に関する重要度を処理工程毎に評価し、さらに評価された重要度を基に HACCP 方式による衛生管理総括表を作成し、併せてと畜検査員による汚染確認方法およびと畜場への指導内容の検討をおこなった。

わが国で行われている豚と畜処理方法の実

態調査を行い、処理方法を以下の 3 タイプに分類した。

- ① オーバーヘッド方式：と殺後、と体を吊り上げたまますべての処理を行う。
- ② ベッド方式：と体洗浄後、いったん自動搬送ベッドにと体を降ろし、胸割り、腹割り、股割りおよび肛門周囲処理などの前処理を行った後、と体を吊り上げて以降の処理を行う。
- ③ 湯はぎ方式：前処理はオーバーヘッド方式と同じだが、剥皮を行わず、湯漬け、脱毛、毛焼きの処理を行う。

これらの 3 つの方式それぞれについて、基本的な処理工程を定め、その工程毎に微生物による汚染要因に関する重要度の評価をおこなった。目視によると体への汚染の有無およびふき取り検査等の結果から、汚染発生の重要度により、重要度 1 (汚染の要因として極めて重要：非常に汚染を受けやすい)、重要度 2 (汚染の要因として重要：汚染を受ける可能性がある) および重要度 3 (汚染の要因として重要でない：汚染を受けにくい) の 3 段階で評価した。また、汚染の除去 (低減) に関する重要度の評価については、重要度 1 (汚染を効果的に除去 (低減) する) および重要度 2 (除去 (低減) に効果が望める) の 2 段階に評価した。

と体への汚染の要因という観点から全処理工程を重要度 1～3 の 3 段階で評価した結果、すべての方式に共通して「生体受入れ・係留」、「肛門抜き (ベッド方式では肛門周囲処理)」、「腹割り (股割り)」、「内臓摘出工程」をと体への汚染について最も注意すべき工程 (重要度 1) とした。また他の作業員が直接手を触れる複数の工程も重要 (重要度 2) と考えられた (表

15)。

一方、と体の汚染の除去（低減）について各工程を評価した結果、すべての方式に共通して、と畜工程への汚染の持ち込みを防ぐために重要な「生体受入・係留工程」、と体の汚染を確実に除去できる「トリミング工程」、枝肉の細菌の増殖を防ぐために不可欠な「冷蔵保管工程」を重要度1とした。加えて湯はぎ方式では、温湯への浸漬等による微生物の減少効果が期待できる「湯漬け工程」、体表表面を炎で焼く「毛焼き工程」も重要度1とした。

また、と体をシャワーリング等で洗浄する「生体洗浄」、「と体洗浄」、「枝肉洗浄」の各工程を重要度2とした（表15）。

上記の重要度評価の結果に基づき、HACCP方式による衛生管理事項を検討し、衛生管理総括表を作成した（表16）。汚染および汚染除去に関する重要度評価において重要度1と評価された「生体受入・係留」「肛門抜き（肛門周囲処理）」「腹割り（股割り）」「内臓摘出」「トリミング」「冷蔵保管」「湯漬け」および「毛焼き」工程については、HACCPによる衛生管理で取り扱うことが必要と考えられた。中でも、「生体受入・係留」「トリミング」「冷蔵」「湯漬け」および「毛焼き」工程は、積極的に汚染を排除する工程としてCCPとして管理することが必要であり、それ以外の上記に挙げられた工程については、SSOPにより汚染要因の発生を防ぐことで管理していくことが必要と判断した。

併せて、汚染要因に関する重要度に基づき、解体処理工程における危害要因の発生を防止するためのと畜検査員による汚染確認方法とと畜場への指導内容を示した。

と畜処理工程における汚染要因としては、受入れ時あるいはと殺前の生体の洗浄不足、腸管

破損、と体同士の接触、作業員の衛生管理不良などが挙げられる。それらの汚染要因への対応について、工程毎の評価を踏まえながら衛生管理総括表およびと畜検査員による汚染確認方法とと畜場への指導内容を作成した。前述したとおり、と畜処理の方法にかかわらず汚染に対して注意すべきポイントはほぼ同一であるといえることから、今回作成した総括表等を基に、処理方法等の修正を図っていくことが必要である。

と畜処理は一般的な食品の製造工程と異なり、その製品（枝肉）の特性から加熱等の殺菌工程を設置することは困難である。したがって、と畜処理工程で枝肉をいかに汚染させないかということが非常に重要となる。衛生的な食肉を食卓に提供するため、今後は、と畜処理の衛生管理の必要性と今回定めた具体的な管理方法についてと畜場側と共有し、実践していくことが求められる。

### C. 果実・野菜・漬け物等における食中毒菌の衛生管理に関する研究

漬物は日本特有の一夜漬け、たくあん漬などや、外来のキムチ、ピクルスなど多様である。また、日本特有の漬物にしても外国から原材料が入ってくるケースもある。そのため、海外の衛生状況により、輸入品の汚染状況も変化する。漬物は塩分含有量などから食中毒の原因として考えることは一般的ではない。しかし、過去には一夜漬けや浅漬けが原因の食中毒は実際に起こっている。この原因は、原材料の加熱工程を経ずに喫食される加工品であるため、食中毒の原因となりうる、と考えられるからである。漬物の衛生に関しては、規格基準はなく、指導基準である衛生規範があるのみである。本研究

では、果実・野菜（野菜サラダ等）・漬け物等の製造過程における微生物危害発生防止方策として HACCP モデルプランの構築を目的に、各製造過程における微生物学的危害（サルモネラ、腸管出血性大腸菌 0157）について汚染実態調査を実施する。また、環境中での生残性（ストレス抵抗性）、増殖性等を調査し、食品の製造工程及び保存条件などについて高度衛生管理としての HACCP モデル構築を行う。19 年度および 20 年度は、まず漬物の病原微生物について疫学調査研究を実施した。種々の報告書から漬物に関する情報を収集・分析したところ、食中毒の原因食品が特定された事例については通常の食中毒事例と大差なく発生報告があることが明らかになった。原因病原体に関しては、腸炎ビブリオが多いが、魚介類を中心とした漬物が多いことが原因であろう。しかし、リステリア属菌に関しては今まで調査されていなかった。発生施設や発生時期に関しても、他の食中毒事例と大差はなく、その他発生要因や、発生事例に関しても、漬物に特有のものではなく、漬物に関しても何らかの製造基準を設ける必要が示唆された。さらに、市販されている浅漬けを中心に、14 店舗から 108 サンプル数を購入し、*Listeria* spp.、*Salmonella*、Coliform、*E. coli* 0157、一般生菌数を調べた。浅漬けの内容は、白菜やキャベツを中心に製造されたものである。リステリア属菌は、15 検体から分離された。さらに、浅漬けの工場 2 箇所の製造工程を調査すると共に、実際に食中毒原因菌について危害分析を行った。さらに、浅漬けを中心とした漬物を一般小売店から購入し、汚染状況を調べた。同時に、漬物による食中毒事例に関する情報を収集し、漬物の食中毒との関連についてまとめた。

北海道内の漬物工場 2 件（A 工場、B 工場）の協力のもとに、製造工程における細菌検査を行った。また、市販品は一般小売店より購入し実施した。購入サンプルは、225 グラムを別紙記載の方法でストマッカー処理を行い、検査に使用した。

A 工場においては、原材料の白菜からリステリア属菌（*Listeria* spp.）が分離されたが、製品や製品製造途中の他の食材からは分離されなかった。その他、リステリア、サルモネラ、0157 および *E. coli* は分離されなかった。さらに、工場内のふき取り検査では上記菌種は分離されなかった。B 工場においては、工場内ふき取り検査および食材や製品から *Listeria* spp. が高頻度に分離された（表 17、18）。一般性菌数の高い場所では、*Listeria* spp. が分離されやすい傾向はみられた。その他の病原菌に関しては分離されなかった。B 工場の汚染度が高かったことから、B 工場において危害分析を行い、衛生管理向上のモデルとして追跡した。製造工場内および製品のリステリア汚染の制御方策として工場外部との遮断の強化（外部からのフォークリフトや台車等の工場内への侵入制限、入場前にサニタリー室において靴殺菌、手洗い、エアシャワーを経由すること、など）と、工場内で施設設備および機械器具等を殺菌する殺菌剤に、グラム陽性菌に対して効果のある「第 4 級アンモニウム塩（塩化ベンザルコニウム）」の採用を行った。さらに、製造工場内の一般生菌数の制御方策として、洗剤、殺菌剤、ブラシなどの洗浄ツールの整備、清掃・洗浄マニュアルの徹底、衛生管理チームの発足を行い、さらに北海道が運営する HACCP 評価を受けることを目標と定めた。20 年度に B 工場を再度調査したところ、リステリアの制御について、昨年度と

比較し検出率が有意に低下した。(工場内拭き取り検査→H19年度 21.9%、H20年度 2.6%、半製品および製品→H19年度 73.3%、H20年度 0.0%)。一方、工場内の一般生菌数の制御については未だ十分な成果が現れず、衛生管理チームによる一般的衛生管理事項の改善を進めた。21年度にはリステリア検出は陰性となった。さらに、工程ごとに危害分析を行い HACCP プランを構築し、自治体が行っている HACCP 評価についても「段階 6」を達成した。表 19 および 20 に HACCP プランとハザード分析表を示す。本 HACCP プランは、漬け物工場における HACCP 導入のモデルに活用可能である。

また、北海道の代表的な漬け物製品である「ニンジン漬け」において、製造工程での食中毒菌に対する危害分析を行った。その結果、各工程での拭き取り検査から大腸菌、腸管出血性大腸菌 0157、サルモネラ属菌、*Listeria monocytogenes* は検出されなかった。しかし、原料として使用した身欠きニンジンから *L. monocytogenes* が検出され、さらに漬け物製品 10 検体すべてが *L. monocytogenes* 陽性と判定された。

冷凍原料の身欠きニジンは、一般生菌数が  $3.4\sim 6.1\times 10^7$ cfu/g、大腸菌群が  $1.8\sim 2.9\times 10^7$ cfu/g と非常に高く、水戻し後に殺菌剤で処理しても菌数は減少せず、製品中の身欠きニンジンもほぼ同様の菌数であった。このように冷凍原料段階での菌数が高く、さらに検査した全ての身欠きニンジンに *L. monocytogenes* が検出されており、身欠きニンジン製造時の衛生環境に問題があったと推察された。また、漬け物製品中の身欠きニジンは、水分活性 0.963、pH6.7 と *L. monocytogenes* が増殖可能な値であり、保管温度には十分注意が必要と考えられた。なお、

使用した身欠きニジンの製造業者は特定されなかったことから、購入原料の履歴を明らかにすることも重要である。

副原料の野菜類については、カット前のダイコンとキャベツで、一般生菌数  $10^6\sim 10^7$ cfu/g、大腸菌群  $1.0\sim 1.8\times 10^4$ cfu/g と非常に高かったが、カット後の野菜類は一般生菌数  $1.2\sim 5.3\times 10^3$ cfu/g、大腸菌群 300cfu/g 以下と低くなった。これは、カット時に野菜類の皮や泥の付いた部分を除去したことやオゾン水による洗浄効果であることが明らかとなった。また、カットしたニンジンから *L. monocytogenes* が検出されたが、これは身欠きニンジンとの接触が原因と考えられた。以上のように、カット後の野菜へ泥や食中毒菌が汚染しないためには、作業手順の遵守が重要と思われた。

作業環境調査において、作業 1 日目のテーブルや作業員手指などは、一般生菌数が  $10^4$  レベルで大腸菌群が 300cfu/100cm<sup>2</sup> 以下と低かった。また、作業 2 日目の作業員手指で大腸菌群がやや増加したが、これは手指と接触したザル等などの汚染と考えられた。なお、作業室温は 18℃ 以下、漬け込み室温は 10℃ 以下と低く、大きな問題はなかった。調査の結果、当該工場の衛生管理は、概ね良好であったが、一般的衛生管理事項の再点検と改善および定期的に身欠きニジンの細菌検査を実施するなど、常に汚染状況を把握することが重要と考えられた。

#### D. 衛生管理における食中毒菌のモニタリングに関する研究

##### D-1. バイオフィルムを形成するリステリアの食品製造工程における衛生管理に関する研究

非加熱喫食食品に汚染が認められるリステリア・モノサイトゲネスは、その製造工程における



バイオフィーム形成が本菌の食品への汚染の原因となっていることが指摘されている。乾燥や高濃度の食塩耐性、低温増殖性といった環境抵抗性を示し、バイオフィーム形成が見られるリステリアの食品製造工程における衛生管理に適したモニタリング方法を提案し、食品製造工程や保存における増殖性の評価、バイオフィームの形成防止と本菌の除去を目指した管理法を検討することを目的とした。

文献調査と web 情報等の収集により、バイオフィームに関する情報収集を行った。リステリアの試験法については、アクリフラビン量の異なる (10~15mg/L) 各種市販 EB 培地を用い、増菌培地について検討を行った。各種 EB 培地で 48 時間増菌後、増菌液中のリステリア・モノサイトゲネス菌数を測定した。製造工程におけるバイオフィーム形成の実態調査は、北海道立釧路水産試験場の協力により行った。イカ塩辛および塩たらこ製造など 2 箇所の水産加工品の製造工程における一般生菌数、大腸菌群、リステリアの汚染実態について検討した。

東部沿岸で漁獲されたスケトウダラを用い、塩たらこ製品を製造している水産加工品を製造する事業所で実施した。原魚裁割から魚卵の取り出しと原卵漬け込み処理、塩たらこ製品の箱詰めに至る工程で使用される器材、並びに作業環境よりバイオフィームを採集した。

バイオフィームは滅菌済みのマイクロスパーテルあるいはスクレイパーを用いて、バイオフィームを器材および作業環境より剥離し、滅菌済み蓋付き小型試験管(樹脂製)に採集した。菌叢構成菌の DNA 分析とリステリア属菌の同定は帯広畜産大学で行った。*L. monocytogenes* が検出された木製パレット由来のバイオフィームと、リステリア属菌の分離された箇所のバイオフィームのマイクロフ

ローラ解析を行った。分離菌株から鋳型 DNA を抽出・精製した後、常法にしたがって塩基配列を決定した。これを GeneBank から出されている 16S-rRNA をコードする DNA の塩基配列に対してホモロジー検索を行って、分離株の菌種を推定した。

研究協力をいただいた施設をフィールドとし、製造工程における一般生菌数、大腸菌群、リステリアの汚染実態について調査した。形成されたバイオフィームの除去方法の検査、調査施設は北海道釧路の 2 箇所をお願いした。平成 19 年度はイカ塩辛製品をはじめ魚卵、貝類などを原料とした水産加工品を製造する事業所を対象とした。平成 20-21 年度は、北海道  
討については、バイオフィームが付着しているザルカコ(持ち手部)を使用し、洗浄(ブラッシング、洗剤:3%レディクリーン エコラボ)、スチーム(スチームクリーナー SC1402 ケルヒャジャパン)、塩素浸漬(100ppm 次亜塩素酸 ナトリウム)または、洗剤浸漬(1%プリンシパル エコラボ)をそれぞれ行った後、水洗し、拭き取りを行い、一般生菌数を測定した。また、洗浄後にスチーム処理を行い、さらに各浸漬をする処理区、および洗浄後にスチーム処理を行わず各浸漬をする処理区を作製し、各工程中の拭き取りを行い、一般生菌数と ATP 発光量を測定し、洗浄効果を比較した。ATP 発光量の測定は、ルミテスター PD20(キッコーマン)を用いた。なお、スチーム処理はスチーム温度 50~70°C、ノズルから 5~10cm の距離で 30 秒間行い、各浸漬処理の浸漬時間は 18 時間であった。

バイオフィームに関する文献調査と情報収集を行い、バイオフィームに関する情報を整理したところ、リステリアでは、製造工程に形成されたバイオフィームが、最終製品のリステリア汚染に大きく関わっており、その除去が本菌の管理に重要であることが確認された。バイオフィームは多分

野(工業、医療、食品、環境等)に渡り研究、報告がなされており、また目的も金属の腐食防止、感染症予防、食品汚染防止、バイオフィルムの性質を利用した汚染海域の浄化と様々である。バイオフィルムの研究を行うためのモデルの開発もなされており、排水処理施設におけるシミュレーションモデルやリステリア・モノサイトゲネスのバイオフィルムに対する抗菌剤の効果を調べるモデルとして、表面処理したステンレス片やテフロンフィルム片をリステリア・モノサイトゲネス混合細胞液に浸して培養することにより、バイオフィルムを人工的に作成する方法が報告されている。人工的に *L. monocytogenes* のバイオフィルムを形成させる際に影響を及ぼす因子として考えられるものとしては①株の性質、②バイオフィルムを形成させる素材、③菌の phase、使用する増菌培地、④共存する他の微生物などがある。使用する *L. monocytogenes* 株については、血清型によりバイオフィルムの形成しやすさに違いがあると考えられている。素材への粘着性を調べた結果 1/2c は 1/2a や 4b と比較して粘着性が良いという報告がなされている。

バイオフィルムから常に分離される (persistent) 株は突発的にまたは、たまにしか分離されない (sporadic) 株と比較してバイオフィルムを形成しやすい。バイオフィルムを形成する素材は、実際に食品製造工場で生産ラインに用いられているステンレス(表面加工の違いや素材自体の金属の配合の違いにより非常に様々なタイプが存在している)やベルトコンベアと同素材のゴム、パッケージングのプラスチック、その他のガラス、テフロンフィルムなどについて検討されている。

リステリア試験法については、市販の培地では選択剤であるアクリフラビンの濃度が異なってお

り、その性能に差があるのではないかとされていた。各種市販 EB 培地の増菌効果を比較したが、アクリフラビン量の差異による大きな違いは認められなかった。一方、食品の種類によりリステリアの増菌後の菌数に影響を与える場合があることが確認された。

イカ塩辛製造所における実態調査については、製造工程中の拭き取り検査を実施した。解凍原料から脱水処理工程において、原料と直接接する器材等の一般生菌数を見ると、まな板、作業台表面、流し台、裁割・洗浄原料保管ザル、塩漬け用たらい(金属製)、加圧脱水処理用水切りザルでは、いずれも  $<300\text{cfu}/100\text{cm}^2$  と顕著に低く、大腸菌およびリステリアは検出されず衛生的であった。しかし、解凍原料の裁割と洗浄肉の角切りに使用する包丁の一般生菌数は、いずれも  $10^4\text{cfu}/100\text{cm}^2$  と比較的高い値となり、包丁の適切な洗浄・殺菌が必要であると考えられた。また、加圧脱水処理工程にて使用する重石(樹脂包埋・円柱型)でも一般生菌数は  $10^4\text{cfu}/100\text{cm}^2$  を示した。加圧脱水工程における中間製品への交叉汚染を防除するためにも、重石については適切な洗浄・殺菌が求められると考えられた。なお、裁割および角切り用包丁、重石のいずれからも、大腸菌およびリステリアは検出されなかった。また、作業台の脚ではバイオフィルムの固着が認められ、その一般生菌数は  $10^6\text{cfu}/100\text{cm}^2$  と顕著に高い値を示したものの、大腸菌およびリステリアは検出されなかった。イカ塩辛製造工程(図1)、イカ塩辛製造工程における拭き取り検査結果(図2)参照。

塩たらこ製造所における実態調査では、平成20年度の1回目の調査で、1箇所から *L. monocytogenes* が分離された。図3にバイオフィルムの菌叢解析の流れ図、図4に塩たらこ加工施設のバイオフィルムの一般生菌数を示した。この結果

を受け、平成 21 年度に 2 回目、3 回目の調査を行い、さらに詳しく形成されたバイオフィルムの解析を試みた。各バイオフィルムの一般生菌数と、クロモアガーリステリア寒天培地によるコロニー観察結果と合わせてみると、採集したバイオフィルムの一般生菌数は、たらこ室入り口戸の取手部で  $10^2$  cfu/mg biofilm 以下と低い値であったが、これを除く検体では  $10^2 \sim 10^6$  cfu/mg biofilm に分布しており、このうち8月と 11 月を合わせた全体の約 77%となる 20 検体で  $10^4$  cfu/mg biofilm 以上であった。なお、たらこ室入り口戸の取手部の一般生菌数が他と比べて顕著に低い値を示したが、これは採集した試料の大部分が鉄錆等であり、バイオフィルムがほとんど含まれていなかったことによるものと推測した。

クロモアガーリステリア寒天培地によりリステリア属菌と推定したバイオフィルムの一般生菌数は、 $10^2 \sim 10^6$  cfu/mg biofilm の範囲に分布し、2回目の調査の剥皮機の上面カバー一部で  $1.3 \times 10^6$  cfu/mg biofilm と最も高い値を示し、次いでフォークリフトのアクセルペダル部が2~3回目の調査ともに  $10^4$  cfu/mg biofilm 台を示した。一方、工場外砂利道の土壌は  $10^2$  cfu/mg biofilm 台であった。また、2 回目の調査でリステリア属菌陽性と推定した剥皮機の上面カバー一部は3回目の調査では陰性で一般生菌数は  $10^3$  cfu/mg biofilm 台と低い値であった。図5に2回目の調査におけるバイオフィルムの一般生菌数とリステリア属菌の検出箇所を示す。リステリア属陽性のバイオフィルムでは、一般生菌数が  $10^7 \sim 10^9$  cfu/g biofilm に分布し、剥皮機・上面カバー部で  $1.3 \times 10^9$  cfu / g biofilm と最高値を示した。また、リステリア属菌陽性であったフィレーマシ、原魚処理用作業台、貯水タンク、木製パレットからは検体採取時期によりリステリア属菌は検出されず、フォーク

リフト・アクセルペダル部のみ3回の調査のいずれでも検出された。このことから、フォークリフト・アクセルペダル部における継続的なリステリア属菌汚染が明らかとなった。表21にリステリア属菌の疑われる箇所の菌叢の菌叢に関する一覧を作成した。

なお、大腸菌は採集したすべてのバイオフィルムにおいて陰性と推定された。

今回調査した全 23 検体のバイオフィルムのうち、最も多く検出された菌種はフラボバクテリウム属(12 検体)、ロドコッカス属(11 検体)、クラビバクター属 (10 検体)の 3 種類であった。シュードモナス属(5 検体)、アシネトバクター属(5 検体)、カルコバクター属(4 検体)なども比較的多くの箇所で見られた。これらの一般生菌が、バイオフィルム中のリステリア属菌の有無と関連があるかを調べるために、リステリア属菌陽性バイオフィルム 8 検体とリステリア属菌陰性バイオフィルム 15 検体の計 23 検体における、一般生菌の出現割合を比較するため、リステリア属菌と一般生菌の存在割合を検討した。これらのうち、グラメラ属、パラコッカス属、サイクロバクター属は 25%のリステリア属菌陽性バイオフィルム中に検出されたが、リステリア属菌陰性バイオフィルムには 6.7%しか検出されず、出現割合に約 3.7 倍差があった。推定した一般生菌の菌種を属ごとに分類し、リステリア属菌と一般生菌の有無により2x2分割表を作成してフィッシャーの直接確率法により確率 p を求め、有意差検定を行った。これらの解析結果より、p 値が 0.05 未満となる一般生菌はみられず、有意水準 5%でリステリア属群の有無と一般生菌の出現割合に差がないことがわかった。

バイオフィルムの防除試験結果 バイオフィルムが付着しているザルカコ(持ち手部)を洗浄(ブ

ラッシング)、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬をそれぞれ行った時の拭き取りによる一般生菌数の変化の結果から、それぞれ単独処理では、一般生菌数はスチーム処理が洗浄前の  $10^6$ cfu/25cm<sup>2</sup> 台から  $10^4$  cfu/25cm<sup>2</sup> 台に減少した以外、他の処理は減少しなかった(図6)。写真1に示すように、見かけ上はバイオフィームが消失したかのように見えても、高い一般菌数が見られる。特にブラッシング後は、汚れは全く見えなくなっているが、細菌学的には一般生菌数は1桁も下がっていなかった。そこで、洗浄(ブラッシング)を行った後、スチーム処理を行い、さらに各浸漬をする処理区、および洗浄後にスチーム処理を行わないで、各浸漬をする処理区の各工程中の拭き取りによる一般生菌数および ATP 発光量の変化の結果から、一般生菌数は洗浄前が  $10^7$ cfu/25cm<sup>2</sup> 台であったものが、洗浄後、スチーム処理をすることにより  $10^5$ cfu/25cm<sup>2</sup> 台に減少し、さらに塩素浸漬、洗浄浸漬によりそれぞれ  $10^3$  cfu/25cm<sup>2</sup>、 $10^2$ cfu/25cm<sup>2</sup> に減少した。また、洗浄後、スチーム処理を行わずに塩素浸漬、洗剤浸漬を行ったものはそれぞれ  $10^5$ cfu/25cm<sup>2</sup>、 $10^2$ cfu/25cm<sup>2</sup> に減少した。また、ATP 発光量では、洗浄前に比べ、スチーム処理での減少が少なかったが、その後の塩素浸漬で減少し、特に、洗剤浸漬で著しく減少した(図7)。

原料作業台(上面)及びフィレーマシンの出口部カバー部より各濃度の Tween 80-生理的食塩水(滅菌済み)に浸漬した綿棒で拭き取り、適宜、同濃度の Tween 80-生理的食塩水で希釈した時の一般生菌数を調べた。原料作業台では 0%、0.1% に比べ 0.25%、0.5% でやや高い傾向を示したが、著しい差は認められなかった。また、フィレーマシンの出口部カバー部では、0%と 0.1% では差は認められなかった。各バイオフィームに 0%(無添加)および 0.1% Tween 80-生理的食塩水(滅菌済み)を

加え、乳剤を調整、希釈し、一般生菌数を比較した。各バイオフィームとも無添加と 0.1% 添加では著しい差は認められなかった。

乾燥や高濃度の食塩耐性、低温増殖性といった環境抵抗性を示し、バイオフィーム形成が見られるリステリアの食品製造工程における衛生管理に適したモニタリング方法を確立し、バイオフィームの形成防止と本菌の生産ラインからの除去を目指した管理法を検討している。バイオフィームに関する文献調査と情報収集を行い、バイオフィームに関する情報を整理し、バイオフィームを構成する菌に関する情報収集と、バイオフィームの除去に関する文献を重点的に集めた(参考となるバイオフィームの文献リストを添付した)。

現場におけるバイオフィームに関する検討としては、北海道立釧路水産試験場の協力により、イカ塩辛製造所及び塩タラコ製造所の作業工程における調査を行った。製造工程をとおして、一般生菌数、大腸菌群、リステリアの汚染実態について調査した。イカ塩辛製造所からは *L. monocytogenes* は分離されなかった。塩タラコ製造施設において、1回目の調査でリステリアの分離が確認されたことから、2~3回目の調査を行いバイオフィームに関する検討を行った。20箇所26検体(2回目:20箇所、3回目:6箇所)より採集したバイオフィームのうち、2箇所(3検体)のバイオフィームからリステリア属菌を推定した。1回目の調査で *L. monocytogenes* を分離した箇所を含め、その後の調査では *L. monocytogenes* の検出される箇所はなかったが、工場内においてリステリア属菌を検出したことから、原魚裁割工程における原卵への交叉汚染が容易に推測される。

水産加工施設において採取した 52 箇所のバイオフィーム(1~3回目の調査)のうち、11 箇所のバイオフィームからリステリア属菌を推定した。

そのうち 1 箇所は *L. monocytogenes* であった (2008年度に分離)。リステリア属菌 の検出割合としては、2008 年度(1回目)分 離では 26 検体中 8 検体(30.7%)、2009 年度 (2回目)では 20 検体中 2 検体(10.0%)、3 回目では 6 検体中 1 検体 (16.7%)であり、高率でリステリア属菌が検出されている。2008 年度に比べ 2009 年度の成績には改善が見られた。また、フォークリフト・アクセルペダル部における継続的なリステリア属菌汚染も明らかとなった。工場内においてリステリア・モノ サイトゲネスおよびリステリア属菌を検出したことから、原魚裁割工程における原卵への交叉汚染が推測される。

当該施設で採集したバイオフィルムにリステリア属菌が陽性を示した理由の一つとして、当該施設が未舗装の道路に隣接しており、運搬 作業や気象条件等により、土壌が施設内に持ち 込まれやすい環境にあるためと考えられる。特に、フォークリフト・アクセルペダル部は足で 踏んで操作を行うため、特に土壌からの汚染を 受けやすいと考えられる。リステリア属菌の検 出割合が 2008 年度に比べて 2009 年度で減少しているのは、第 1 回目の調査である 2008 年度の結果を受けて、水産加工施設が自主的に施設内の整頓・清掃を実施した影響によるものと思われる。

バイオフィルムの防除方法の検討として、バイオフィルムが付着しているザルカコ(持ち 手部)を用いて、洗浄(ブラッシング)、スチ ーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬を行った。写真 1に示すように、例えばブラッシングによる洗 浄後は、見かけ上汚れは消失し、バイオフィルムは完全に除去されたかのように見えるが、生 菌数は  $10^6$  を超えており、洗浄前の菌数とあまり変化していない。このように肉眼に頼る判断はあてにならないので注意が必要である。塩素浸漬、洗剤浸漬では、単独

の処理では一般生菌数の減少が認められなかったが、洗浄処理後に各浸漬処理を行うことにより減少した。これは、洗浄処理によりバイオフィルムが除去され、このことにより、各浸漬処理の除菌・殺菌が進行したものと考えられる。洗浄後の処理では、スチーム処理、塩素処理は一般生菌数の減少に一定の効果を示したが ATP 発光量の減少は少なかった。また、スチーム処理により、バイオフィルムの表面が熱変性を生じ、剥離等が困難になる可能性があり、付着箇所の状況を判断して使用する必要がある。これに対して、洗剤浸漬は一般生菌数、ATP 発光量とも著しく減少した。これらのことより、スチーム処理、塩素処理は除菌・殺菌効果が認められるが、有機物等の除去・洗浄には効果が認められなかった。一方、洗剤浸漬は、除菌・殺菌に加え、有機物等の除去・洗浄にも効果が認められた。

モニタリングの方法として、一般生菌数等の測定に、バイオフィルムを溶解させ、均一な乳剤を得るために、生理食塩水に 0.1%の Tween 80 を添加している。今回、バイオフィルム生 成箇所においてのふき取り及び各バイオフィルムの Tween 80 添加の有無による一般生菌数の比較を行った。ふき取りにおいては、0.25%、0.5%の高濃度で比較的高い傾向を示したが、0.1%では無添加に比べ差は認められなかった。また、各バイオフィルムにおいても差は認められなかった。今回使用したバイオフィルムは比較 的ウェットなものであり、溶解しやすいものであったと考えられる。今後、難溶のバイオフィルムについても検討する必要がある。

#### D-2. カンピロバクター試験法に関する検討

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊

な培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、食品における本菌の汚染を調べることは困難であった。さらにカンピロバクターは、酸素や乾燥ストレスに弱いため、食品検査に於いて試験法が異なると検出結果が大幅に異なってしまう。国内にはカンピロバクターの微生物基準はなく、公定法がないため、統一した試験法での汚染実態調査は行われていない。試験法を検討するためには、基準となる試験法の確立が必須である。平成19年度は工程管理などの試験としておこなう場合に適する微好気培養法の検討を行い、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気条件下においても本菌の増菌培養が可能であることを示した。この方法は広く汚染実態を調査する目的にはたいへん有用であると思われる。この方法が試験法としてどの程度の信頼性を持つか、あるいは今後国際的に広く認められる方法であるか判断するためには、基準となる標準試験法における成績と比較し、科学的根拠のあるバリデーション（妥当性確認）を行わなくてはならない。基準となる試験法（ISO法など）をプロトコル化し、標準試験法を確定し、その上で今回開発した新しい試験方法の正当性を評価することが必要である。そこで研究班ではISO法を基に検討を進め、標準試験法案を作成し、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”に検討を依頼した。作業部会案として認められたことから、コラボ試験に向け検討を進めた。菌株を人工的に接種した鶏肉について、9箇所の機関で研究室間共同試験を行った。その結果を解析し、広く用いることのできるカンピロバクター標準試験法のコラボ案作成を進めた。

#### 1) 特殊ストマッカー袋による微好気培養の検討とその評価

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部より配布された通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋（A法、10袋）および通常のストマッカー袋（B法、10袋）に入れられた凍結ボルトン培地を解凍し、添加液を封入した小袋を破壊後、混和し実験に用いた。培養は、通常のインキュベーターを用いた好気培養で行った。試験方法は、国立医薬品食品衛生研究所がweb上で公開している“食品からのカンピロバクター（ジェジュニ/コリ）の試験法案（ステージ2：作業部会案）NIHSJ-02-ST2”に従って実施した。また、試験方法の対照として、自家調製のボルトン培地（Oxoid）と通常のストマッカー袋を用いた微好気培養を行い（C法）上記方法との成績を比較した。

通気性の無い素材を用いた特殊ストマッカー袋で、好気培養を行った結果と、通常のストマッカー袋を用い微好気条件で培養した場合の検出は、冷蔵鶏肉で38検体中それぞれ20と19の検出、凍結鶏肉（解凍品を含む）で42検体中それぞれ14と16、合計で80検体中それぞれ34と35で、検出率はほぼ均しかった（表22）。通常のストマッカー袋で好気培養を行った場合も増菌が認められたが、特殊ストマッカー袋での好気培養や、通常のストマッカー袋による微好気培養と比べると検出率は低かった。図8に微好気培養の方法を示した。

図9に、特殊ストマッカー袋を用いて、MPN法により評価した実験の概要を示した。表23に定性及びMPN法による定量評価の結果を示した。Bolton培地の培養では、ISO法では、37℃培養4時間後に42℃への温度シフトが示されている。評価を行ったところ、温度シフトの影響は認められなかった（表24）。

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特

特殊培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、食品における本菌の汚染を調べることは困難であった。今回は特殊な機械を必要としないで、通常用いているインキュベーターを用いてカンピロバクターの増菌が出来ると思われる特殊ストマッカー袋による培養方法を検証した。ボルトン培地を通気性のない特殊ストマッカー袋に入れ、微好気ガス置換を行うことにより、従来の微好気培養で増菌した場合とほぼ同等の増菌結果が得られた。さらにボルトン培地を市販の通常ストマッカー袋で好気培養した場合も、複数の検体でカンピロバクターが検出されたが、この方法では、上記の方法と比べると明らかに検出率は低下した。今回の検討では、定性で行っているので統計的な考察は難しいが、特殊フィルムを用いる増菌法は、大変有用な方法と期待されるため、今後更に検体数を増やして、その検出精度を検証してゆくべきであると思われた。

## 2) 冷蔵鶏肉を用いたカンピロバクター標準試験法の実験室間共同研究

あらかじめ25g ずつ鶏挽肉をストマッカー袋に計量し、人工的に菌株を接種した検体を、共同研究者に送付し、カンピロバクター標準試験法作業部会案に従い、試験を実行した。試験は、国立医薬品食品衛生研究所がweb 上で公開している“食品からのカンピロバクター(ジェジュニ/コリ)の試験法案(ステージ2:作業部会案)NIHSJ-02-ST2”に従って実施した。研究室間共同試験の規模は、9 試験所で、陽性試料2 濃度各3 回反復、陰性試料3 回反復で行った。陽性試料は高濃度接種群3、低濃度接種群3、非接種群3の合計9 を、増菌培地2 種類で行うこととし、計18 試料を配布した。各機関の試験結果を収集し、定性試験法の評価法に従い評価し、2 種類の増菌培地の比較と、選択寒天

平板培地との組み合わせについて評価した。増菌培地はISO 法で用いられているボルトン培地と、これまで国内で一般的に用いられてきたプレストン培地の性能比較を行った。

鶏挽肉に菌株をスパイクしたのち、4°Cに保ち、菌数の変化を調べたところ、原因は不明であるが、接種24 時間後は計測されるコロニー数が一時的に低くなり、48 時間後に菌数が復活し、72 時間後もその菌数が維持されることがわかった。繰り返し行った接種回収実験で再現性があったため、研究室間共同試験では、人工培養したカンピロバクターを接種した鶏挽肉は、48 時間から72 時間後に試験を行うようにした。自然汚染と思われるカンピロバクターを減菌し、それ以外の鶏肉の菌叢をできるだけ維持させることを目的に、菌株接種前に、鶏挽肉は2 回の凍結融解処理を行った。自然汚染のカンピロバクターの影響は抑えられたが、一部の非接種群の検体から、残存と思われるカンピロバクターが分離され完全に死滅させることはできなかった。非接種群では、自然汚染したカンピロバクターは、血清型により容易に鑑別できた。

冷蔵肉(プレコラボ実験1)、冷凍肉(プレコラボ実験2)の実験プロトコールを表24の次のページに示した。プレコラボ実験1の検体採取の流れを図10に示した。コラボ実験1では、配布した試料の共雑菌のレベルは高く、選択能の低い選択寒天平板培地上では、共雑菌が覆うように増殖し、カンピロバクターの有無の判定の出来ない培地も見られた。選択増菌培地と選択寒天平板培地の組み合わせによっては共雑菌が高いレベルでも、カンピロバクターの分離は可能であった。9 箇所得られたデータの形式を統一して結果を集計したものを集計表として示した。ボルトン培地、プレ

Preston培地の定性試験の集計をそれぞれ表25、表26に、感度・特異性の評価を表27に示した。

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊な培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、食品における本菌の汚染を調べることは困難であった。平成19年度は特殊な機械を必要としないで、通常のインキュベーターを用いてカンピロバクターの増菌が出来ると思われる新たな試験法として、特殊ストマッカー袋による培養を検証した。その結果、新たな方法は実用性が高い培養法であることが示された。

研究班の開発した方法を広く用いるとすると、国際的に用いられているISO法との比較に於いてどの程度の感度や精度で試験を行うことが可能であるかを、国際的に通用する評価法でバリデートする必要がある。国内では、カンピロバクター試験法の公定法がないため、厚労科研費の“食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究”研究班が行っている標準試験法検討委員会に、カンピロバクター標準試験法の提案を行い、ISO法に準じた標準試験法の原案および作業部会案の提案を行った。委員会で作業部会案として認められた試験法を用い、カンピロバクター試験法の妥当性確認をどのように行えば良いか、検証することにした。

カンピロバクターでは、菌が非常に死にやすいため、菌の添加・回収実験が可能であるかも不明である。培養した菌液を2濃度設定し、各協力研究者に配布した場合、実際に菌が回収可能であるかを、n=3で評価した。供試菌接種前に鶏挽肉を2回凍結融解することにより、自然汚染と思われるカンピロバクターの影響はかなり抑えられたが、一部の非接種群の検体から、残存と思われるカンピロバクターが分離されてしまった。このことか

ら、自然汚染の疑いのある鶏肉からのカンピロバクターの完全な排除は技術的に難しく、今後の試験ではあらかじめカンピロバクターの汚染レベルの低い鶏肉を選ぶことは重要である。現実的には低いレベルの自然コンタミはどうしても発生することを前提に試験結果を評価しなければならないと思われる。

### 3) 冷凍鶏肉を用いたカンピロバクター標準試験法の実験室間共同研究

冷凍鶏肉について前年度と同様な検討を行った。研究室間共同試験の規模は、9試験所で、陽性試料2濃度各3回反復、陰性試料3回反復で行った。陽性試料は高濃度接種群3、低濃度接種群3、非接種群3の合計9を、増菌培地2種類で行うこととし、計18試料を配布した。各機関の試験結果を収集し、定性試験法の評価法に従い評価し、2種類の増菌培地の比較と、選択寒天平板培地との組み合わせについて評価した。増菌培地はISO法で用いられているボルトン培地と、これまで国内で一般的に用いられてきたプレストン培地の性能比較を行った。選択培地上に増殖した集落を純粋培養し、菌種を調べると共に、抗菌剤の耐性獲得状況などその性質を明らかにした。

鶏挽肉を25gずつ取り分けた後、定めた菌数のカンピロバクターを接種し、検体を凍結した。平成20年度と同様に菌株接種前に、鶏挽肉は2回の凍結融解により、自然汚染と思われるカンピロバクターの菌数を低下させた。残存と思われるカンピロバクターが分離されたが、非常に少なかった。非接種群からの分離は血清型別により接種菌でないことを確認できた。冷凍肉を用いたプレコラゴ実験2の検体採取の流れを図11に示した。配布した試料の共雑菌のレベルは高く、選択能の低い選択寒天平板培地上では、共雑菌が覆うように増殖



し、カンピロバクターの有無の判定の出来ない培地も見られた。特にボルトン増菌したのち、mCCDAに接種した場合、ほとんどの平板上にカンピロバクター以外の集落の形成が見られた。選択増菌培地と選択寒天平板培地の組み合わせによっては、カンピロバクターの分離は可能であった。

9箇所を得られたデータの形式を統一して結果を集計したものを集計表として示した。ボルトン培地、プレストン培地の定性試験の集計をそれぞれ表28、表29に、感度・特異性の評価を表30に示した。この集計表を基に、それぞれの培地の性能に関する考察を試みた。選択培地上に増殖した集落を純粋培養し、菌種を調べたところ、大腸菌およびクレブシエラであった。抗菌剤の耐性獲得状況などからそれらはいずれも、拡張型βラクタマーゼ産生菌(ESBL)であることがわかった。

平成20年度と同様な実験を、凍結鶏肉を用いて行った。カンピロバクターでは、菌が非常に死にやすいため、菌の添加・回収実験が可能であるかは不明であったが、平成20年度の結果から冷蔵肉では添加回収実験が可能であることが確認できた。一方、凍結鶏肉では、菌接種後に鶏肉を凍結することが必要である。この場合添加菌が試験に耐える程度に生残するかは不明であった。培養した菌液を2濃度設定し、各協力研究者に配布した場合、実際に菌が回収可能であるかを、n=3で評価した。供試菌接種前に鶏挽肉を2回凍結融解することにより、自然汚染と思われるカンピロバクターの影響はかなり抑えられた。今後の評価ではあらかじめカンピロバクターのコンタミのレベルの低い鶏肉を選ぶことが必要がある。平成21年度は平成20年度に比べてこの点が大きく改善し、非接種群からの自然汚染によるカンピロバクター検出は最小限に抑えられた。2回行った添加回収実験は、実際の標準試験法を妥当性確認するためのプレコ

ラボ試験の位置づけで行った。これまでの共同研究と今回のプレコロラボにより、これまでに明らかにされたのは以下の9項目である。

①市販の鶏肉にはこれまでの検討で、約7～8割程度の確率で自然汚染のカンピロバクターが存在するため、挽肉とした後、凍結融解を繰り返しカンピロバクターの検出を試験に影響を与えないレベルに低下させ、かつ鶏肉の正常菌叢をできるだけ維持することができることを実証した。

②鶏肉に接種したカンピロバクター菌株が、低温、あるいは凍結で保存した場合、どの期間菌数を保てるかの知見を得た。

③人口接種された菌株は、検体輸送中に生存し、菌数を維持できるかについて知見を得た。

④コラボスタディが行える程度に菌数変化のレベルが抑えられるか知見を得た。

⑤ボルトン培地とプレストン培地という2種類の選択増菌培地の性能がどの程度異なるかの基礎データを得た。

⑥それぞれの選択増菌培地から、分離寒天平板培地に接種した場合、カンピロバクターの分離が可能であるかの基礎データを得た。

⑦選択増菌培地と分離寒天平板培地の組み合わせの優劣があるかの基礎データを得た。

⑧鶏肉のカンピロバクター分離に適する選択増菌培地と分離寒天平板培地の組み合わせはどれかに関する基礎データを得た。

⑨このシステムがコラボ試験に耐えるかどうか評価することが出来た。

以上から、カンピロバクターの標準試験法のコラボ案を作成し標準試験法検討委員会へ提案した。巻末に、研究班が作成して標準試験法検討委員会へ提案し評価を受けた試験法案を添付資料として付けてある。添付資料1は原案、添付資料2は作業部会案、添付資料3はコラボ案である。

鶏肉から分離された共雑菌の検討から、これらの菌は、拡張型βラクタマーゼ産生菌（ESBL）であり、近年鶏肉汚染が急速に広まっているようである。国際標準法であるISO法では、カンピロバクターの増菌培地にボルトン培地、選択培地にmCCDAを指定している。この組み合わせであるといずれもβラクタム系抗菌剤を利用しているかことからカンピロバクターの分離に差し支えると思われた。今回の成績でも、この組み合わせではほぼ全てのmCCDA平板培地上に共雑菌の集落が観察されている。選択平板培地としてバツラーなど他の選択剤を用いている培地を併用することが重要である。

今回検討した市販鶏肉からのボルトン培地を用いた通気性のない特殊ストマッカー袋による好気培養は、従来の微好気培養によるカンピロバクター検出法とほぼ同等の成績を示した。この方法は、

微好気培養用の特殊な機械のない試験室においてもカンピロバクター試験を行うことを可能とする有用な方法であると思われる。今後、この方法については検体数を増やし、定量的考察を加えたさらなる検証を行う必要があると思われる。

カンピロバクター標準試験法の作業部会案の研究室間共同試験により、カンピロバクターの妥当性確認を行うための基礎的なデータおよび、コラボ案決定に必要な基礎的なデータを得ることが出来た。この検討により標準試験法のコラボ案を作成した。今後は、今回の検討結果に基づき、最終コラボを実施し、標準試験法を作成すると共に、研究班が作成した特殊ストマッカー袋を用いた試験法の妥当性確認を行うことが期待される。

現在の国際標準法であるISO法は、鶏肉へのESBLの急速な汚染拡大により、検出能力が低下しつつあり、早急な見直しが必要と思われる。

表1 由来別供試株数

由来	株数	感受性試験数
盲腸便	1956	477
ふき取り	598	152
合計	2554	629

表2 盲腸便からのサルモネラ分離状況(月別)

年月	農場			頭数		
	検査数	陽性数	%	検査数	陽性数	%
平成19年10月	7	5	71.4	26	12	46.2
平成19年11月	156	33	21.2	490	69	14.1
平成19年12月	148	16	10.8	425	23	5.4
平成20年1月	45	11	24.4	227	19	8.4
平成20年2月	46	10	21.7	171	20	11.7
平成20年3月	99	22	22.2	243	31	12.8
平成20年4月	41	10	24.4	118	18	15.3
平成20年5月	148	29	19.6	446	43	9.6
平成20年6月	84	14	16.7	257	23	8.9
平成20年7月	101	23	22.8	319	39	12.2
平成20年8月	80	27	33.8	253	59	23.3
平成20年9月	94	19	20.2	264	30	11.4
平成20年10月	74	16	21.6	224	24	10.7
平成20年11月	7	3	42.9	21	3	14.3
計	1130	238	21.1	3484	413	11.9

\* 同一農場の複数回検査について、検査日が同じ月内の場合は1農場として、異なる月に実施した場合はそれぞれの月で1農場として計上

表3 盲腸便からのサルモネラ検出状況(施設)

検査機関	農場			頭数		
	検査数	陽性数	%	検査数	陽性数	%
北海道	160	12	7.5	499	18	3.6
岩手県	36	9	25.0	108	16	14.8
宮城県	51	4	7.8	157	4	2.5
秋田県	20	9	45.0	163	43	26.4
群馬県	126	8	6.3	382	8	2.1
新潟県	68	5	7.4	284	9	3.2
静岡県	75	6	8.0	259	8	3.1
三重県	70	9	12.9	218	14	6.4
兵庫県	86	34	39.5	337	77	22.8
鳥取県	60	34	56.7	192	70	36.5
愛媛県	34	22	64.7	105	40	38.1
鹿児島県	265	71	26.8	530	89	16.8
沖縄県	79	15	19.0	250	17	6.8
合計	1130	238	21.1	3484	413	11.9

月別検査数・陽性数からの集計(同一農場の複数回検査について、検査日が同じ月内の場合は1農場として、異なる月に実施した場合はそれぞれの月で1農場として計上)

表4 盲腸便由来株の血清型と12薬剤に対する感受性

	O群	血清型	株数	耐性薬剤(株数)	感受性株数	分離施設(株数)
1	4	Typhimurium	84	ABPC/CET/CFX/KM/TC(1)、 ABPC/CET/TC(2)、 ABPC/TC/GM(1)、ABPC/TC(9)、 ABPC/TC-DT104(30)、KM/TC(2)、 ABPC/CET(1)、CET/TC(1)、 CET(1)、ABPC(6)、TC(17)	13	岩手(2)、静岡(13)、 兵庫(21)、三重(2)、 鳥取(3)、鹿児島 (25)、沖縄(2)愛媛 (14)、宮城(2)
2		Derby	70	ABPC/KM/TC(1)、ABPC/TC(1)、 ABPC(1)、CET(2)、TC(13)	52	北海道(8)、岩手 (2)、秋田(2)、新潟 (1)、静岡(1)、三重 (3)、兵庫(5)、鳥取 (21)、鹿児島(17)、 沖縄(4)、愛媛(5)、 宮城(1)
3		Agona	22	CET/TC(1)、KM/TC(1)、 FOM誘導耐性(3)	17	岩手(3)、秋田(8)、 群馬(1)、兵庫(6)、 鹿児島(4)
4		O4:i:-	5	ABPC/TC/CET(1)、ABPC/TC(1)	3	岩手(1)、静岡(1)、 鹿児島(3)
5		Schwarzengurund	4	TC(2)	2	群馬(2)、兵庫(1)、 鹿児島(1)
6		Saintpaul	3		3	宮城(1)、鹿児島(2)
7		Brandenburg	1		1	北海道
8		O4:-	1	ABPC/TC(1)	0	鹿児島
9		O4:d:-	3		3	北海道(1)、鳥取 (1)、静岡(1)
10		O4:i:Z4Z32	2	ABPC/TC(1)、TC(1)	0	群馬(2)
11	7	Infantis	34	ABPC/CAZ/CET/CFX/CTX/TC(1) 、ABPC/CAZ/CET/CFX/TC(7)、 ABPC/CET/TC(1)、 ABPC/FOM/TC(1)	24	岩手(1)、新潟(3)、 三重(7)、兵庫、鳥 取(13)、鹿児島(7)、 愛媛(3)
12		Livingstone	6		6	岩手(1)、秋田(4)、 鳥取(1)
13		Tennessee	2		2	静岡(1)、鹿児島(1)
14		Choleraesuis	4	ABPC/TC(1)、ABPC(1)、TC(2)	0	群馬(2)、鹿児島 (1)、沖縄(1)
15		Choleraesuis Kunzendorf 生物型	8	ABPC/KM/TC(1)、ABPC/TC/FOM 誘導耐性(1)、FOM誘導耐性(4)、 ABPC/TC(1)	1	鹿児島(8)
16		Lockleaze	5		5	鳥取(5)
17		Mbandaka	4	TC(4)	0	鹿児島(1)、沖縄(3)
18		7:-:1,5	2	TC(1)	1	群馬(1)、鹿児島(1)
19		Kottbus	4		4	鹿児島(4)
20	8	Albany	1		1	沖縄(1)
21		Kentucky	1		1	鹿児島(1)
22		Manhattan	1	TC(1)	0	鹿児島(1)
23		Newport	2	TC(1)	1	愛媛(1)、鹿児島(1)
24	6,8	Muenchen	1		1	兵庫(1)
25	9	Miyazaki	1	ABPC/CAZ/CET/CFX/TC/FOM誘 導耐性(1)	0	鹿児島(1)
26		Panama	1	TC(1)	0	愛媛(1)
27	1,3,19	Senftenberg	2		2	群馬(1)、沖縄(1)