

カンピロバクター 3回目

1、2号舎 29日齢 3、4号舎 27日齢

	増菌	直接
飼料	—	—
盲腸便1号舎	×	—
盲腸便2号舎	×	—
盲腸便3号舎	×	—
堆積糞1号舎	×	—(大腸菌)
堆積糞2号舎	×	—(Enterococcus faecalis)
堆積糞3号舎	×	—(Enterococcus faecalis)
野鳥の糞	—	—
ネズミの糞	—	—
使用中の長靴底面	×	—(Enterococcus faecalis)

カンピロバクター 4回目

1、2号舎 42日齢 3、4号舎 40日齢

	増菌	直接
飲用水原水	—	—
貯水槽1号舎	—	—
貯水槽2号舎	—	—
貯水槽3号舎	—	—
飲用水鶏舎内手前1号舎	—	—
飲用水鶏舎内手前2号舎	—	—
飲用水鶏舎内手前3号舎	—	—
飲用水鶏舎内中1号舎	—	—
飲用水鶏舎内中2号舎	—	—
飲用水鶏舎内中3号舎	—	—
使用中の長靴底面	×	—

	増菌	直接
飲用水鶏舎内奥1号舎	—	—
飲用水鶏舎内奥2号舎	—	—
飲用水鶏舎内奥3号舎	—	—
飼料	—	—
盲腸便1号舎	×	—
盲腸便2号舎	×	—
盲腸便3号舎	×	—
堆積糞1号舎	×	—
堆積糞2号舎	×	+ (<i>C. coli</i>)
堆積糞3号舎	×	—
野鳥の糞	×	—
ネズミの糞	×	—

平成24年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

分担研究報告書

3. 食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

研究分担者 森田幸雄
研究協力者 北川詠子、塩野雅孝、藤田雅弘、松田錦弥、星野富男
石岡大成、古茂田恵美子、重村泰毅、鈴木智之、木村博一

と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化とカンピロバクター等の制御に関する研究

分担研究項目: 食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御

研究協力者 北川詠子 塩野雅孝 藤田雅弘 松田錦弥 星野富男

群馬県食肉衛生検査所

石岡大成

群馬県衛生環境研究所

古茂田恵美子 重村泰毅

東京家政大学

鈴木智之

岐阜大学医学部附属病院

生体支援センター

木村博一

国立感染症研究所

分担研究者 森田幸雄

東京家政大学

研究要旨

カンピロバクター食中毒の制御を行うために A 食鳥処理場に搬入される農場のカンピロバクター保菌率や食鳥処理工程でのと体のカンピロバクター汚染調査を実施するとともに、分離菌の菌種や血清型等について検討した。また、市販されている牛、豚、鶏ひき肉のカンピロバクター汚染状況について検討した。*Campylobacter* は 22%(6 検体)の鶏ひき肉から分離され、分離菌は全て *C. jejuni* であった。鶏ひき肉は *C. jejuni* 食中毒の感染源となりうる事が再確認された。カンピロバクターは 40%(165/415 検体)の食鳥と体検体、59%(16/27 農場)の農場から検出された。食鳥処理場に搬入された鶏は高率にカンピロバクターを保菌していることが再確認された。食鳥処理場に搬入される鶏がカンピロバクターを保菌していない場合には食鳥処理場内でカンピロバクターの汚染が生じておらず、カンピロバクター汚染の無い鶏肉を生産できることが判明した。また、保菌鶏群を処理した場合、そのと体からカンピロバクターを分離したことから、施設内での交差汚染が広がっている可能性が示唆された。しかしながら、チラー通過後のと体からは、カンピロバクターが検出されないと体もあることから、チラー水の塩素濃度管理によりある程度はカンピロバクター汚染を制御できることが示された。カンピロバクター食中毒の制御を行うためにはカンピロバクター非汚染鶏を生産し、非汚染鶏を食鳥処理場で処理することで可能となり、そのためには、カンピロバクター汚染鶏と非汚染鶏を的確に区別することが必要であると思われた。

A. 研究目的

2011年の厚生労働省の食中毒統計によると、細菌性食中毒発生件数でカンピロバクターによるもの第1位(336件)であり食品衛生上重要な細菌である。カンピロバクターは食鳥と体や市販鶏肉から高率に分離されており、その多くが *C. jejuni* であること^{1, 2)}、*C. jejuni*は冷蔵庫内でも長期間生存すること³⁾、比較的少量の菌量の摂取でも食中

毒を発症すること⁴⁾、そして食中毒のみならずその後ギランバレー症候群(末梢神経麻痺性疾患)を発症する事例もあること⁵⁾等から食品衛生上のみならず医学的にも注目されている。カンピロバクター食中毒の制御のためには農場での衛生対策ポイントの検討、食鳥処理場での衛生対策、流通段階における対策が重要である。

農場での衛生対策ポイントの検討では、農場

へ鶏群が導入された時点ではカンピロバクターを
保菌していないが、数週間たつと保菌する。その
原因となるものは人、機材、飲水、餌、昆虫や小
動物などが考えられている^{6, 7)}。これらの組み合
わせも考えられるが、主たる原因について疫学的
および細菌学的方法により検討することが重要
である。

食鳥処理場での衛生対策では、これまでの脱
羽工程、中抜き工程、冷却工程等の組み合わせ
に加え、食品安全委員会の食品健康影響評価研
究で指摘された方法、すなわち、非汚染鶏から汚
染鶏の順番で食鳥処理を行う方法による汚染状
況の変化に関して実際に農場で実施しその効果
を確認することが重要と考える⁸⁾。

流通段階においては、冷凍処理によるカンピロ
バクターの低減効果等に着眼し、冷凍保存条件
を実験的に検証することが重要と思われる。

以上のカンピロバクター食中毒の制御を実施
するために、本年度はA食鳥処理場に搬入され
る農場のカンピロバクター保菌率や食鳥処理工
程でのと体のカンピロバクター汚染調査を実施す
るとともに、分離菌の菌種や血清型等について検
討した。また、市販されている牛、豚、鶏ひき肉の
カンピロバクター汚染状況について検討した。

引用文献

- 1) Ono, K.; Yamamoto, K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama. Int. J. Food Microbiol. 1999, vol.47, p.211-219.
- 2) 清水泰美, 星野利得, 石岡大成, 森田幸雄, 黒田 晃, 花岡康夫. 食鳥処理場における細菌汚染調査. 日獣会誌. 1998, vol.51, p.608-612
- 3) Lee, A. Smith, S. C. Coloe, P. J. Survival and Growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. J. Food Prot. 1998, vol.61, p.1609-1614.
- 4) Black, R. E. Levine, M. M. Clements, M. L., Hughes, T. P. Blaser, M. J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. J.

Infect. Dis. 1988, vol.157, p.472-479.

- 5) Dingle, K. E. Van Den Braak, N. Collins, F. M. Price, L. J. Woodward, D. L. Rodgers, F. G. Endtz, H. P. Van Belkum, A. Maiden, M. C. Sequence Typing Confirms that *Campylobacter jejuni* Strains Associated with Guillain-Barré and Miller-Fisher Syndromes Are of Diverse Genetic Lineage, Serotype, and Flagella Type. J. Clin. Microbiol. 2001, vol. 39, p.3346-3349.
- 6) 鶏病研究会. 生産現場におけるカンピロバクター汚染実態とその対策. 鶏病研報, 2001, vol. 37(4), p. 195-216.
- 7) 高木昌美. 鶏におけるカンピロバクター汚染. 鶏病研報, 2002, vol. 38S, p.25-34.
- 8) 食品安全委員会通知府食第596号, 平成21年6月25日, カンピロバクター・ジェジュニ/コリの食品健康影響評価の結果
http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyo2-campylobacter_k_n.pdf

B. 研究方法

1. A 食鳥処理場でのカンピロバクター汚染調査

a) 搬入鶏におけるカンピロバクター保菌調査

2011年11月から2012年12月の間に、A食鳥処理場に搬入された鶏の盲腸内容物を、ロット毎に5羽ずつ採取した。検体1gを10倍量のPreston ブイオン(Oxoid)で42°C, 24hr 微好気培養後、Butzler agar (Oxoid) およびmCCDA (Oxoid)を用いて42°C, 48hr 微好気培養をおこなった。また、検体を10倍量のPBSで乳剤化後、3000rpmにて10分間遠心し夾雑物を除き、上清をButzler agar およびmCCDAに塗抹培養した(図1-1)。疑わしいコロニーをグラム染色、LAラテックス凝集試験(デンカ生研)でスクリーニングし、アピヘリコ(バイオメリュー)により同定した。また、klenaらの方法⁹⁾に従いmultiplex-PCRによる菌種同定をおこなった。また、分離された*C. jejuni*について市販血清カンピロバクターLA「生研」(デンカ生研)により耐熱性抗原型別を(Penner)

を実施した。

b) と体の拭き取り検査

拭き取り検査は、2012年5月から12月の間に実施した。5月に4回、7月に3回、10月に2回および12月に2回実施した。と体のカンピロバクター拭き取り検査は「食鳥処理場における HACCP 方式による衛生管理指針」(1992)に記載された方法でおこなった。と体の拭き取りを行った工程は脱羽後、内臓摘出後および本チラー通過後とし、処理する鶏群が切り替わるごとに概ね、懸鳥開始1時間後、2時間後、さらに3時間後(処理終了前)にと体を採材した。同一ロットのと体3羽の胸部(25cm²×3)を滅菌ガーゼ出拭き取り、30mlのPBSに浮遊させた。2倍濃度 Preston ブイオンに等量の拭き取り液を加えて、42°C、24時間微好気培養後、mCCDA、Butzler agar に塗抹し42°C、48hr 微好気培養をおこなった(図1-2)。同時に、処理される鶏群の盲腸内容を、ロットごとに5羽ずつ採取した。検体1gを10倍量の Preston ブイオンで42°C、24hr 微好気培養後、Butzler agar およびmCCDA を用いて42°C、48hr 微好気培養をおこなった。また、検体を10倍量のPBSで乳剤化後、3000rpmにて10分間遠心し夾雑物を除き、上清を Butzler agar およびmCCDA に塗抹培養した。分離平板上に生じた疑わしいコロニーについて、保菌調査と同様に菌種同定のため multiplex-PCR を実施し、市販血清による血清型別をおこなった。

2. 市販牛・豚・鶏ひき肉のカンピロバクター汚染調査

2011年5月から11月の間に東京・埼玉・茨城・千葉県・群馬県の食肉販売店50店舗から牛ひき肉を50検体、鶏ひき肉27検体、豚ひき肉17検体を購入した。購入後、冷蔵保存し、消費期限内に検査に供した。

検体25gを225mlのPreston ブイオンに加え、42±1°C、25±1hr、微好気条件下(80%N₂、10%CO₂、5%O₂、5%H₂)で増菌培養後、Butzler

agar および mCCDA に塗抹し、42±1°C、48±2hr、微好気培養した。各分離培地上の *Campylobacter* を疑う乳白色露滴状集落を1~5個釣菌し、純培養後、オキシダーゼ陽性、グラム陰性のS字状桿菌について菌体DNAを InstaGene Matrix により抽出後、Yamazaki-Matsune¹⁰⁾が報告したPCR法を用いて菌種の同定を行った。

引用文献

- 9) Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PM, Horn ST, Miller WG, Konkel ME. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. J. Clin. Microbiol. 2004, vol.42(12), p.549-557.
- 10) Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N, Tsukamoto T. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. J. Med. Microbiol. 2007, vol.56(Pt 11), p.1467-1473.

C. 研究結果

1. A 食鳥処理場でのカンピロバクター汚染調査

a) 搬入鶏におけるカンピロバクター保菌調査

Campylobacter は415検体中165検体(39.8%)検出された。また、*Campylobacter* は27農場中16農場が陽性であった。*Campylobacter* の分離方法は Preston ブイオンで増菌した場合は分離培地として Butzler agar を用いることが適していたが、増菌培養せずに便乳剤の遠心上清を直接 Butzler agar に塗抹培養したほうが効率よく分離された(表1-1)。multiplex-PCRにより同定した結

果は、アピヘリコの結果と完全に一致した。

分離された *Campylobacter* は 3 農場で *C. coli* が分離されたが、その他はすべて *C. jejuni* であった。分離された *C. jejuni* の Penner 血清型は B, C, F, L, Y, Z6 群であったが、農場ごとにそれぞれの個体から分離された血清型は同一であった。

b)と体の拭き取り検査

と体の拭き取り検査では *Campylobacter* 非保菌鶏群を処理した場合には、いずれの工程・時間帯においても *Campylobacter* は検出されなかった(表 1-2)。しかしながら、*Campylobacter* 保菌鶏群を処理した場合、脱羽後および内臓摘出後のと体から *Campylobacter* が検出された(表 1-3)。非保菌鶏群を処理した後に保菌鶏群を処理すると、その時点から脱羽後、内臓摘出後およびチラー水通過後のと体から *Campylobacter* が検出された(表 1-4)。非保菌鶏群が、保菌鶏群の直後に処理されると脱羽後、内臓摘出後のと体から *Campylobacter* が検出された。しかしながら、本チラー水通過後のと体からは *Campylobacter* は検出されない検体も存在した(表 1-5)。

保菌鶏の調査には、Preston ブイオンで増菌するよりも、内容物の 10%乳剤を遠心処理した場合に検出率が高かった。処理された鶏の腸内容物から分離された *Campylobacter* は、と体から分離された菌株と同一の菌種・血清型が多く存在した(表 1-6)。農場での汚染が保菌鶏の処理とたいの汚染へと波及することが判明した。

2. 市販牛・豚・鶏ひき肉のカンピロバクター汚染調査

Campylobacter は 22%(6 検体)の鶏ひき肉から分離され、分離菌は全て *C. jejuni* であった(表 2-1)。

D. 考察

1. A 食鳥処理場でのカンピロバクター汚染調査

Campylobacter は 40%(165/415 検体)の検体、59%(16/27 農場)の農場から検出された。食鳥

処理場に搬入された鶏は高率に *Campylobacter* を保菌していることが再確認された。

Campylobacter 非保菌鶏群を処理した場合、いずれの工程からも *Campylobacter* がと体から検出されなかった。このことから、食鳥処理場に搬入される鶏が保菌していない場合には食鳥処理場内で *Campylobacter* の汚染が生じておらず、*Campylobacter* 汚染の無い鶏肉を生産できることが判明した。また、保菌鶏群を処理した場合、そのと体からカンピロバクターを分離したことから、施設内での交差汚染が広がっている可能性が示唆された。しかしながら、チラー通過後のと体からは、*Campylobacter* が検出されないと体もあることから、チラー水の塩素濃度管理によりある程度は *Campylobacter* 汚染は制御できることが考えられた。また、鶏群の保菌状況を把握する上で、増菌培養を行わず、腸内容物の乳剤を選択分離培地に塗抹培養し疑わしいコロニー用いて multiplex-PCR をおこない、搬入前に把握することが必要であると考えられた。

2. 市販牛・豚・鶏ひき肉のカンピロバクター汚染調査

森田ら¹¹⁾は 2002 年に群馬県内の食肉販売店で購入し牛ひき肉 50 検体、豚ひき肉の 50 検体から *Campylobacter* は分離できないことを報告している。牛および豚ひき肉は我が国の食肉由来の食中毒である *Campylobacter* のリスク要因としての役割は低いと思われた。いっぽう、鶏ひき肉では *Campylobacter* が 22%(6/27 検体)から分離され、*C. jejuni* が多く分離された。これらの結果は過去の報告^{12,13)}と同様で、鶏ひき肉は *C. jejuni* 食中毒の感染源となりうることが再確認された。

引用文献

- 11) 森田幸雄, 壁谷英則, 石岡大成, 坂脇廣美, 長井 章, 鈴木宣夫, 中林良雄, 丸山総一, 家畜および市販ひき肉における *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella* の分布状況. 日獣会誌, 2004, vol.57(6), p.393-397.

- 12) 森田幸雄, 壁谷英則, 丸山総一, 長井 章, 奥野英俊, 中林良雄, 中嶋 隆, 見上 彪. 市販鶏ひき肉における *Arcobacter*, *Campylobacter* および *Salmonella* の汚染状況. 日獣会誌, 2003, vol.56(6), p.401-405.
- 13) 古茂田恵美子, 森田幸雄, 田村真理, 山本茂貴, 野田雅博, 小澤邦壽, 木村博一. 市販鶏ひき肉中の *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella* 汚染状況. 日本家政学会誌, 2011, vol.62(11), p.721-725.

E. 結論

市販牛ひき肉, 豚ひき肉では *Campylobacter* は検出されないものの, 鶏ひき肉は *Campylobacter* に高度に汚染していることから, 鶏ひき肉は, *Campylobacter* 食中毒の汚染源として大きな役割を担っていることが再確認された。

Campylobacter の汚染の無い鶏肉を生産するためには, 生産農場で *Campylobacter* を保菌していない鶏群を生産しそれを食鳥処理場で処理することで達成できることが判明した。また, 鶏肉への汚染を少なくするためには非汚染鶏群をはじめに処理し, 次に汚染鶏群を処理することで, 非汚染鶏群の *Campylobacter* 汚染は防止できること, また, 保菌鶏群を処理する際には, チラー水の塩素濃度管理を頻繁にモニターし塩素濃度を維持させることで, ある程度制御できることが考えられた。処理場での保菌鶏を区分処理することが避けられない現状では農場飼育段階での鶏の *Campylobacter* 保菌率を減少させることが, 食鳥処理場での *Campylobacter* 汚染防止対策に繋がるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表等

なし

2. 学会等発表

北川詠子, 水谷昌代, 塩野雅孝, 藤田雅弘, 清水静一, 松田錦弥, 星野富男. 「食鳥処理場に

搬入された鶏のカンピロバクター保菌調査」日本獣医公衆衛生学会(関東・東京地区), さいたま市(大宮ラフォーレ清水園)平成24年9月2日

森田幸雄, 古茂田恵美子, Potjanart BOONMA, 石岡大成, 山本茂貴, 野田雅博, 小澤邦壽, 木村博一, 「市販ひき肉中の *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella* 汚染状況」, 日本食品微生物学会, 福岡市(アクロス福岡)平成24年10月25日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図1-1 搬入鶏におけるカンピロバクター保菌調査に用いた分離方法

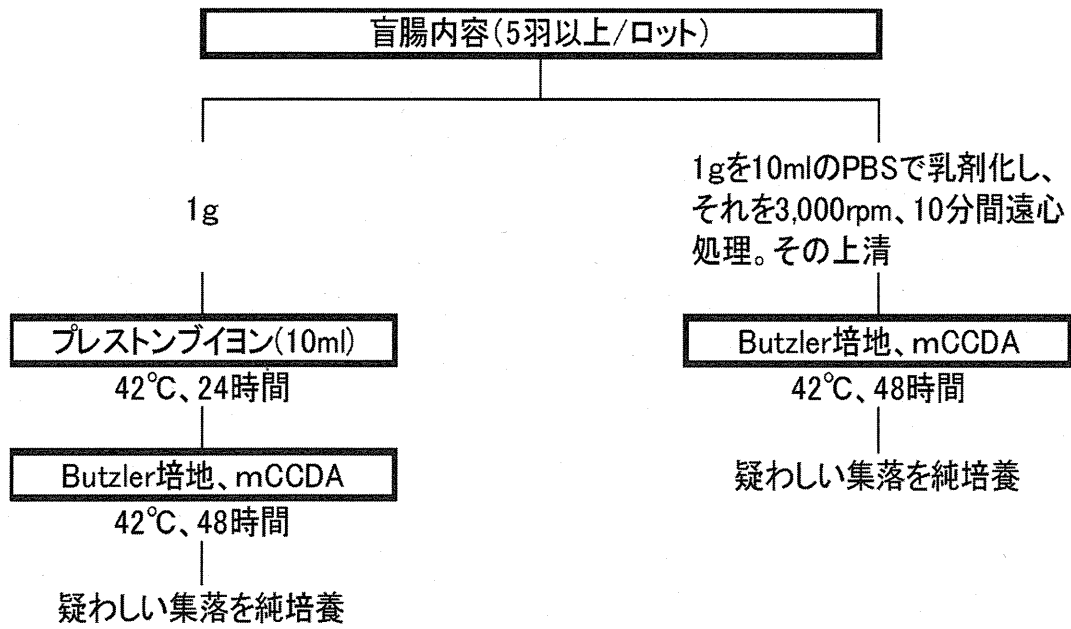


図1-2 と体のカンピロバクター拭き取り検査に用いた分離方法

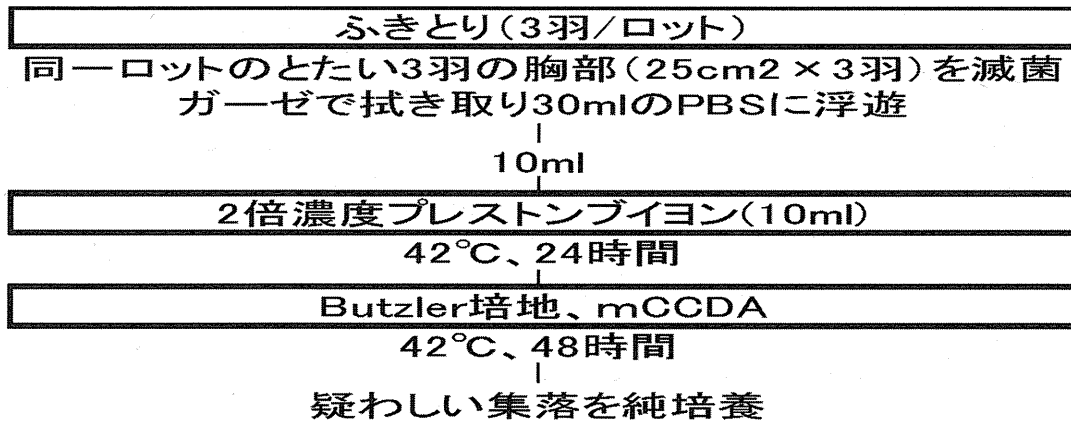


表1-1 分離方法別にみたCampylobacter分離状況

分離培地等 農場数または検体数	プレストンブイオン増菌		遠心上清	
	Butzler培地	mCGDA	Butzler培地	mCGDA
検査農場数	27	27	27	27
陽性農場数	10	7	15	14
農場陽性率(%)	37.0	25.9	55.6	51.9
検体数	415	415	415	415
検出数	58	20	152	124
検出率(%)	14	4.8	36.6	29.9

表1-2 盲腸便・ふきとり検査結果(1)

採材日 ロット	盲腸便 (保菌)	ふきとり		
		脱羽後	内臓摘出後	チラー水後
5月14日				
TM	0/5	-	-	-
TM		-	-	-
TT	0/5	-	-	-
5月24日				
OB	0/10	-	-	-
IT	0/10	-	-	-
MF	0/5	-	-	-
12月12日				
TC	0/5	-	-	-
TC	0/5	-	-	-
TC	0/5	-	-	-
12月25日				
OB	0/5	-	-	-
OB	0/5	-	-	-
OB	0/5	-	-	-

表1-3 盲腸便・ふきとり検査結果(2)

採材日 ロット	盲腸便 (保菌)	ふきとり		
		脱羽後	内臓摘出後	チラー水後
5月31日				
KB	4/5	+	+	-
KB	/	+	+	+
IY	5/5	+	+	+

表1-4 盲腸便・ふきとり検査結果(3)

採材日 ロット	盲腸便 (保菌)	ふきとり		
		脱羽後	内臓摘出後	チラー水後
5月10日				
NT	0/5	-	-	-
MF	0/5	-	-	-
FC	5/5	+	+	+
7月26日				
HW	0/5	-	-	-
HW	5/5	+	+	+
TT	5/5	+	+	-
10月30日				
FD	0/5	-	-	-
NG	0/5	-	-	-
KB	5/5	+	+	-

表1-5 盲腸便・ふきとり検査結果(4)

採材日 ロット	盲腸便 (保菌)	ふきとり		
		脱羽後	内臓摘出後	チラー水後
7月10日				
AGF	5/5	+	+	+
NT	0/5	/	/	/
FC	5/5	+	+	-
TC	0/5	+	+	-
7月17日				
AGF	5/5	+	+	+
NT	0/5	+	+	-
KGF	9/10	+	+	+
10月16日				
CF	5/5	+	+	-
CF	5/5	+	+	-
HW2	0/5	/	/	/
TT	5/5	+	+	-

表1-6 農場ごとにみた分離 *Campylobacter* の菌種・血清型等

農場	腸内容物 血清型別	処理と体分離 <i>Campylobacter</i> の菌種・血清型		
		脱羽後	内臓摘出後	チラー水後
FC	J,UT	J,F ¹⁾	J,UT	J
KB	L	L	L	L
IY	B,L,UT	UT	B	—
AGF	UT	F	UT	UT
KGF	B,L,F,UT	UT	UT	UT
TT	L,UT	L	UT	—
CF	Y,UT	C	C	UT
NT	C,UT	C	UT	—
HW	<i>C.coli</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.coli</i>

¹⁾ *Campylobacter jejuni* の Penner 血清型

表2-1 牛・豚・鶏ひき肉の *Campylobacter* の分離状況

検体名	陽性検体数/検体数 (%)	分離菌種
牛ひき肉	0/50 (0)	
豚ひき肉	0/17 (0)	
鶏ひき肉	6/27 (22)	<i>C. jejuni</i> only

平成24年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

分担研究報告書

4. 流通段階におけるカンピロバクター汚染制御に関する研究

研究分担者 朝倉 宏
研究協力者 百瀬愛佳

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

流通段階における鶏肉のカンピロバクター汚染制御に関する研究

研究分担者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
協力研究者 百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

カンピロバクター・ジェジュニ（以下、*C. jejuni*）による食中毒事例は、国内外を問わず最も高い頻度で発生している。疫学情報の集積に伴い、本食中毒の発生には、鶏肉を介する割合が高いと想定される現状を踏まえ、本分担研究では、鶏肉の流通段階におけるカンピロバクター汚染低減に資する手法について検討をおこなった。文献検索を通じ、冷凍処理が最も実用性に富み、アイスランド・デンマーク・ニュージーランドの3カ国で既に実施されていることを確認した。同処理が国内流通鶏肉でのカンピロバクター汚染低減に果たす効果を評価するため、鶏挽肉への添加回収試験を行ったところ、鶏肉中における*C. jejuni*の消長は、菌株・接種菌数により差異を示したが、高菌数（約 10^7 CFU/g）接種時の生存率は、冷凍1週間後には11.8 - 17.8%、2週間後には8.2 - 10.2%へと減少した。また、低菌数（約 10^3 CFU/g）接種検体における生存率は、冷凍1週間で5.4 - 8.3%、2週間で0.6 - 1.4%と推移した。市販流通鶏挽肉における*C. jejuni*陽性率は、処理前検体が40%（20/50検体）であったのに対し、1日・1週間の冷凍処理を行った同一検体のそれは、24%（12/50検体）および12%（6/50検体）と明らかな低減を認めた。以上より、国内に流通する鶏肉のカンピロバクター汚染に対し、冷凍処理は低減効果を示すと考えられた。次年度以降は、当該菌の食品内挙動に関してより精度の高い検証を行うと共に、菌株間の感受性に関する知見を集積し、同法の有効性評価を行いたい。

A. 研究目的

Campylobacter 属菌は微好気性・グラム陰性のらせん状菌であり、ヒトの下痢原性病原細菌として広く知られている。本属菌は1982年に食中毒細菌に指定された比較的新しい腸管系病原菌であり、これまでに18菌科種6亜種3生物型に分類されている。このうち、ヒトの下痢症と最も関連性が高いのは*C. jejuni*及び*C. coli*である。

厚生労働省・食中毒統計によると、*C. jejuni*・*C. coli*による食中毒は、近年わが国で発生する細菌性食中毒の中で最も発生件数が多く、その約9割は、*C. jejuni*、残りの1割は*C. coli*により

発生している。また、散发事例の割合が高いのも、本菌による食中毒の特徴の1つであり、感染患者では2-5日とやや長い潜伏期間を経た後、下痢、腹痛、発熱、悪心、嘔吐、頭痛、倦怠感等の臨床症状を呈する。また、近年では、神経変性症の一種である、ギランバレー症候群（GBS）との関連性も指摘されており、その感染制御へとつながる食品の衛生管理の充実は、広く公衆衛生の向上をはかる上で、必要不可欠な課題であるといえる。

昨年および一昨年の厚生労働科学研究費補助金（H22-食品-一般-009, H23-食品-一般-010）では、国内におけるカンピロバクター食中毒の原

因食品の推定に関する分子疫学的検討を行い、鶏肉がおおよそ 7-8 割のカンピロバクター食中毒の原因となっていることを報告した。これらの成績は、欧米におけるデータともほぼ一致しており、鶏肉における本菌の汚染制御を目指す取り組みが必要であることを示している。

こうした背景をもとに、本研究では鶏肉におけるカンピロバクター汚染制御に資する手法に着目した検討を行うこととした。海外における対策に係る文献検索の探索を通じ、冷凍処理を用いた国内流通鶏肉におけるカンピロバクター汚染低減効果について検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 文献検索

2012 年 5 月 -7 月の間に、PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) を用い、『Campylobacter & freezing』、『Campylobacter & chicken meat』、『Campylobacter & 』を対象用語として文献検索を行った。該当する文献より要旨内容から関連性の高い文献のみ抽出した。

2. 供試菌株及び培地

Campylobacter jejuni NCTC11168 株及び 81-176 株を供試菌株として用いた。培養には Mueller-Hinton 寒天培地 (MHA) (BD Bioscience) 又は Mueller-Hinton broth (MHB) (BD Bioscience) を用い、微好気条件下で実施した。

3. 遺伝子組換え体の作成

GFP 発現・カナマイシン耐性遺伝子 *kan* を含む pMW1007 プラスミド DNA を自然形質転換により、MHA 上で一夜培養した供試菌株に導入した。GFP 蛍光およびカナマイシン耐性形質を元に、転換体のスクリーニングを行い、プラスミド保有を以て確認を行った。得られたクローンはそれぞれ NCTC11168-KM 株及び 81-176-KM 株と命名した。

4. 添加回収試験

25g の国産生鶏挽肉を検体として、滅菌スト

マッカー袋に分取した。MHA 上で一夜培養した NCTC11168-KM 株及び 81-176-KM 株を、検体 1g あたり約 10^7 個もしくは 10^3 個となるよう接種し、 -20°C 下で冷凍凍結を行った。冷凍処理前および処理後 1、2、5、7、14 日目に各検体 (N=3) を取り出し、生存菌数を求めた。菌数測定に際して、約 10^7 個/g 接種群については、225ml の Preston 培地を用いた懸濁溶液を作成し、同段階希釈液をカナマイシン ($30\ \mu\text{g}/\text{ml}$) を含む mCCDA 培地に塗布し、発育コロニー数より生存菌数を求めた。約 10^3 個/g 接種検体については、225ml の Preston 培地に懸濁した後、MPN 法に基づき、算定した。

5. 市販流通鶏挽肉に対する冷凍処理

東京都内で、100-200g/パックとして販売されていた国産生鶏挽肉計 50 検体を購入した。当該検体はラボへ冷蔵輸送後、速やかに 3 検体・25g として滅菌ストマッカー袋へ分取した。このうち、1 検体については速やかに NIHSJ-000 法に基づく定性試験へ供した。残りの 2 検体 (計 100 検体) は -20°C にて冷凍処理を行い、1 日および 1 週間経過後に、各 50 検体を同上の試験に供した。陽性・陰性の判定は、疑わしい発育集落に対して、Cycleave PCR *Campylobacter (jejuni/ coli)* Typing kit (タカラバイオ) を用いた遺伝子検出および DrySpot (Oxoid) を用いた免疫凝集反応により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト臨床情報を包含しておらず、またゲノム情報は分離微生物に関するもののみであるため、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

1. 鶏肉汚染カンピロバクター低減に関する情報収集

本研究では、まず海外を中心とした流通段階での制御法に関する情報を収集するため、文献検索を行った。概要をまとめたのが表 1 である。

冷凍処理を用いた対策は、既にアイスランド・デンマーク・ニュージーランドの3カ国で実施されており、いずれも当該手法の有効性が検証されていた。また、その施策にあたっては、業界による自主的な制度化が糸口となっていた。

そのほかに有効性が挙げられた手法としては、有機酸・バクテリオファージ・放射線等が含まれていた。このうち、有機酸については、実用性はあるが、流通・消費過程における制御が困難であることが問題点として挙げられた。また、ファージを用いた食品中の微生物制御は、これまでも腸管出血性 O157 やリステリア等で報告されている他、米国 FDA の認可を受け、製品化もされているが、カンピロバクターに対する同製品の開発には未だ至っていない。放射線殺菌については、社会的に受け入れられ難い情勢であることに加え、経済性の面で劣っていることが問題点として挙げられた。これらに関わる代表的文献については表 2 および表 3 に列挙したので参照されたい。

以上より、鶏肉におけるカンピロバクター制御に有効かつ実用的な流通段階の手法としては、冷凍処理が最も可能性の高いものとして挙げられた。

2. 冷凍処理を通じた国内流通鶏挽肉における *C.jejuni* の生存性挙動

国内で生産・流通する鶏挽肉を用いて、冷凍処理を通じた *C. jejuni* の食品内挙動を経時的に観察した。本菌は食品内に潜むストレス因子(食塩、糖、pH、酸等)に応じて複雑なストレス応答をとることが知られており、その定量にあたっては、直接塗抹法が最確数法 (MPN 法) に比べて優位性が高いとされる。

直接塗抹法を用いた検討により、検体 1g あたり約 10^7 個となるよう接種した *C. jejuni* NCTC11168-KM 株及び 81-176-KM 株は、1 週間の冷凍処理により、それぞれ 1.2×10^6 および $1.9 \times$

10^6 CFU/g, 2 週間後には 8.2×10^5 および 1.1×10^6 CFU/g へと低減が認められる等、接種菌の食品内生存性は、初期に比較的速やかな、その後は緩慢な低減を示した (図 1)。

これまでに集積された、市販鶏肉におけるカンピロバクター汚染状況を鑑みれば、しかしながら、上記接種菌数は過剰であることは否めない。そこで、より現実的な食品内汚染菌数を想定して、検体 1g あたり約 1.8×10^3 CFU/g となるよう接種し、接種菌の食品内挙動を MPN 法により検討した。結果として、1 週間の冷凍処理により接種菌は、98-145CFU/g、2 週間の冷凍処理により、10-24CFU/g へと生存性を低減させた (図 2)。

以上より、鶏肉中のカンピロバクター汚染に対し、冷凍処理は、少なくとも 1 オーダー程度の低減効果を示すことが明らかとなった。

3. 市販流通鶏肉の冷凍処理を通じた汚染低減効果の検証

冷凍処理に伴う本菌の鶏肉内生存性低減に係る更なる検討を行うため、市販流通鶏挽肉を用いて、自然汚染検体の数的変動を観察した。入手した検体 (n=50) は、速やかに定性試験に供し、20 検体 (40%) は陽性であることを確認した。並行して、同一検体を冷凍処理 (1 日・1 週間) に供し、その後、同様に定性試験を行い、陽性検体数を求めたところ、1 日の冷凍処理を経た検体では、12 検体 (24%)、1 週間の冷凍処理を経た検体では、6 検体 (12%) が陽性を示した。

以上より、冷凍処理は、自然汚染検体に対しても、本菌の生存性低減に有効性を示すことが明らかとなった。

D. 考察

国内で発生するカンピロバクター食中毒では、「生、或いは加熱不足状態での喫食」或いは「器

具や手指を介した二次汚染」が、鶏肉をはじめとする原因食品からの病原体伝播を助長する主な環境要因と考えられており、その衛生管理手法による制御として加熱殺菌が最も有効な方法であることはいままでの間もない。一方で、我が国では生食習慣が一定の割合で存在しており、生鶏肉の流通そのものを規制することは、困難である。

本研究班では、農場から消費に至る過程での鶏肉でのカンピロバクター汚染制御に資することを年頭におき、各ステージでの検討を行っている。その中の分担研究として、本報では流通段階における生鶏肉の汚染対策として、冷凍処理の有効性について検討を行った。

文献検索を通じて、アイスランド・デンマーク・ニュージーランド各国でのカンピロバクター食中毒低減を果たした実績はいずれも、冷凍処理の有効性を示してきたといえるが、これら3カ国では、農場での制御を根幹として、食鳥処理・流通・消費の各過程に対して、総合的な対策を講じている。アイスランドの例では、農場では鶏群毎の汚染確認を経時的に行い、汚染が認められる・或いは汚染が過去2代に渡って認められた鶏群に対しては、食鳥処理後に冷凍を義務付けることが定められている他、汚染鶏群から非汚染鶏群へと転換を果たした農家に対しては助成金を付与する等の対策がとられている。また、消費者に対しては、冷凍・非冷凍の別から、汚染肉かどうかの判断が容易になることに加え、啓蒙活動を持続的に行う等の対策がとられている。国内における鶏群のカンピロバクター汚染度をはかり、食鳥処理・流通等の各過程での対策を考察することは、海外の事例を踏まえても明らかのように、本食中毒の低減に資することが期待される。

本研究では、冷凍処理を通じた鶏肉内カンピロバクター生存率の低下は特に低い汚染菌数での添加回収試験で顕著であり、約1週間の冷凍

処理により、約1対数個程度の菌数低減が期待できることを示した。これらの知見は、海外における成績とほぼ合致しており、従ってその実用化により、国内流通鶏肉の汚染低減が一定の割合ではかられると想定される。

一方で、本菌の食品内挙動にかかるこれまでの知見から、本菌の生存性は必ずしも培養により算定される数値と一致しないとの成績も複数報告されている。従って、次年度以降は本菌の冷凍処理に伴う生存性を、分子生物学的手法を用いて評価し、本年度の成績と併せて考察する必要がある。また、食鳥肉の処理工程では、菌株間に生残性の差異が認められるといった報告もあり、冷凍抵抗性に係る菌株間相違を想定した、より多数の菌株を用いた検証も今後の課題の一つとして想定される。以上の検討を通じて、今後は冷凍処理による本菌の鶏肉汚染低減効果を総合的に評価し、以て鶏肉の流通段階における制御に係る科学的根拠の創出へとつなげたい。

E. 結論

本分担研究では国内に流通する鶏肉を広く汚染するカンピロバクターの流通段階における制御を目標として、添加回収試験および自然汚染検体(流通品)を用いて冷凍処理による制御の有効性を検討した。結果として、本年度は冷凍処理が実用性を顕しつつ低減効果を示しうることを示したといえる。今後は培養法によって得られた低減効果が果たして本菌の生存性の低減と一致しているのか等を分子生物学的手法を用いて精査すると共に、菌株間での冷凍感受性の差異を検証すること等により、冷凍処理の有効性に係る科学的根拠の提供に努めたい。

F. 健康危険情報

(総括報告書にまとめて記載)

なし

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

・ Asakura H, Brueggemann H, Sheppard SK, Ekawa T, Meyer TF, Yamamoto S, Igimi S. (2012) Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. PLoS ONE. 7(11): e48394.

・ Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino S, Igimi S, Yamamoto S. (2012) Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. Biochemical and Biophysical Research Communications. 426 (4): 654-658.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. 冷凍処理を通じた、鶏挽肉中における*C.jejuni*の動態～直接塗抹法による検討～

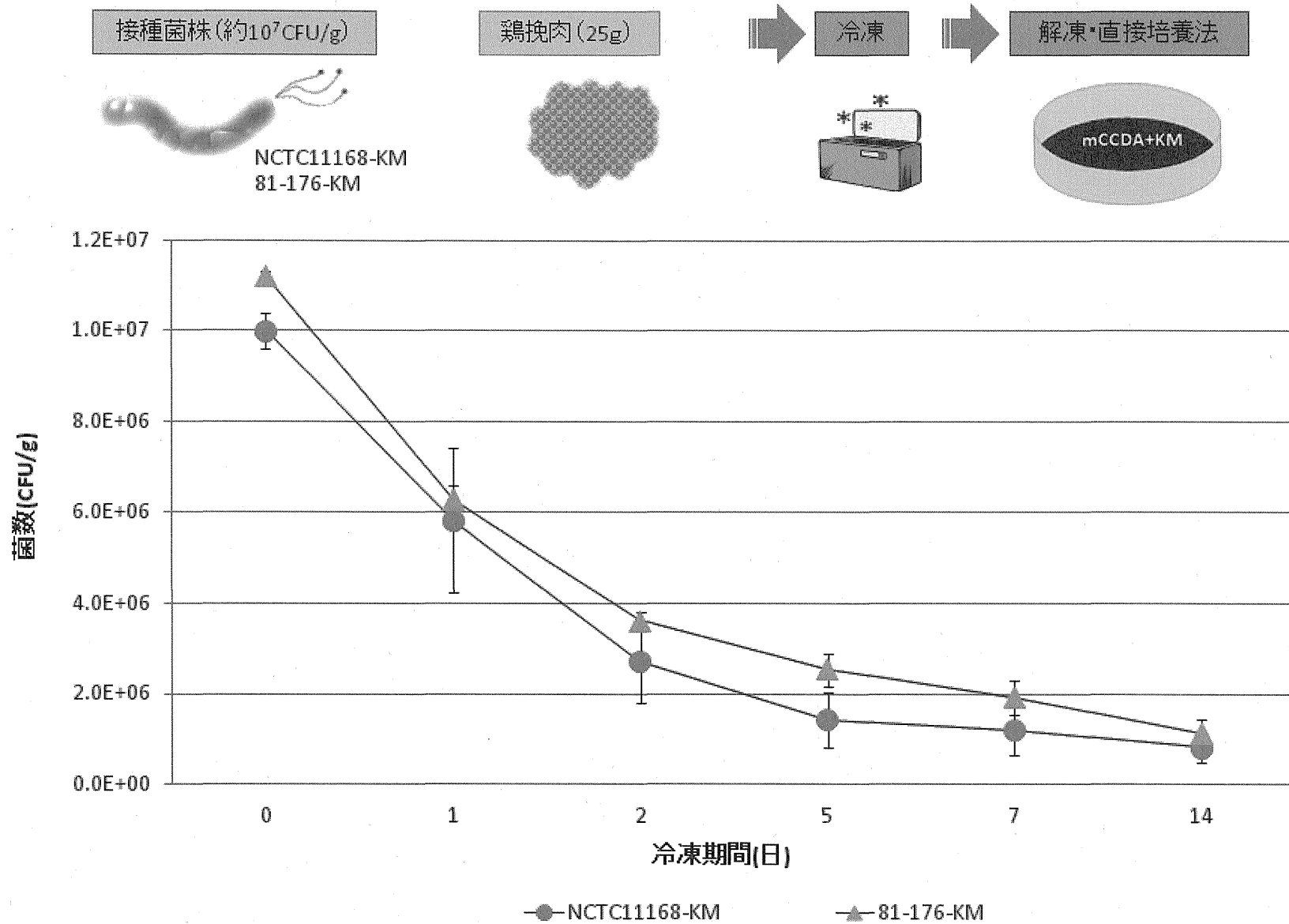


図2. 冷凍処理を通じた、鶏挽肉中における*C.jejuni*の動態～MPN法による検討～

