

細菌性食中毒の中で最も高い頻度で発生しており、その対策は急務の課題であるが、ヒト食中毒の原因食品としては、鶏肉が最も高い割合（約7割）で関連性を示すことから、特に鶏肉汚染に係る基礎・応用的知見の集積が求められる。流通から消費段階における鶏肉汚染制御に関する研究として、本研究では前年度に冷凍処理が諸外国（アイスランド・デンマーク・ニュージーランド）ですでに実用化され、一定の成果、すなわち食中毒数や入院患者数の低減に功を奏している実態を、文献調査を通じて明らかにした。更に、国内流通鶏肉を材料に添加回収試験を行い、当該食品内におけるカンピロバクターの挙動を培養法により評価した。得られた成績は、同処理が本菌の培養性を一定の割合で低減させることを示すものであり、その応用的有効性が示唆された。

本年度は、カンピロバクターは微好気性という特性等を背景に、培養性と生存性が必ずしも一致しないという報告もあることをふまえ、冷凍処理に伴う本菌の生存性挙動を培養性と併せて比較・検証することで、冷凍処理の菌数低減に対する有効性を精査することを目的とした。更に、菌株間での各種環境ストレス抵抗性に差異があること、そしてこれに関連してゲノム多様性に富む性状等を鑑み、菌株間における冷凍抵抗性に関する検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株及び培地

Campylobacter jejuni NCTC11168-KM 株 及び 81-176-KM 株および、鶏より分離された計 20 株の野外株を本試験に供した。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。

2. 添加回収試験

25g の国産生鶏挽肉を検体として、滅菌スト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。冷凍処理より 0、2、5、7、14 日目に各検体 (N=3) を取り出し、225ml の Preston 培地を用いた懸濁溶液を作成した。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、発育コロニー数を算定し、食品内の生存菌数を求めた。

3. EMA-PCR 法

項目 3. の検体中に含まれる微生物群集を Fukuhima らの方法 (参考文献 1.) に従って、粗精製した後、Viable Campylobacter Selection kit for PCR および LED Crosslinker 12 (タカラバイオ) を用いて、指示書に従ってエチジウムモノアザイド (EMA) 染色を行った。同時に非染色検体を併せて調整した後、染色検体と共に、Nucleospin Tissue XS kit (マッハライ・ナーゲル) を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA を鋳型として、Cycleave PCR Campylobacter (*jejuni/coli*) Typing kit (タカラバイオ) を用いて、Light Cycler 480 (ロッシュ・ダイアグノスティック) で定量 PCR 反応を行った。非 EMA 染色検体のデータを 100% とした場合の、EMA 染色検体データの定量値を求め、生存性を評価した。

4. 菌株間の冷凍抵抗性比較試験

MH ブロスで一夜培養した鶏由来 *C. jejuni* 20 株を検体 1g あたり 10^7 オーダー CFU となるよう、鶏挽肉 25g (N=3) 中に添加し、2・7 日間冷凍下で保存した。保存後の検体に、225ml の Preston 培地を添加した後、培養を行い、mCCDA 培地上で発育した集落数を求めて、生存菌数を求めた。出力データの統計学的処理にあたっては、菌株毎の平均値を元に、

接種時（処理 0 日後）の数値を対照とした場合の F 値を算出し、処理 2 日後と 7 日後のデータの比較を行った。

（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、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

1. 冷凍処理を通じた、鶏挽肉中における *C. jejuni* の生存性と培養性の比較検証

NCTC-KM 及び 81-176-KM 株を鶏挽肉 25g に約 10^7 CFU/g となるよう接種し、冷凍後の生存性および培養性を経時的に評価した。両数値は冷凍時点より経時的に低減傾向を示し、冷凍 7 日目での生存率は NCT11168-KM 株では 19.1%、81-176-KM 株では 22.1% であり、同培養率（回収分離率）はそれぞれ 14.6% 及び 18.6% であった（図 1）。一方、冷凍 2 日目における NCT11168-KM 株の生存率・培養率は、37.6% および 31.3% であり、81-176-KM 株ではそれぞれ 42.1% および 33.6% であった（図 1）。両数値間の比較により、冷凍 2 日目の 81-176-KM 株においてのみ、統計学的有意差をもって生存性が培養性を上回ることが明らかとなった（図 1）。

以上より、鶏肉中のカンピロバクターは冷凍処理に伴い、生存性と培養性を減少させたが、その低減傾向は、冷凍初期において一定の乖離を示すことが明らかとなった。

2. *C. jejuni* 菌株間の冷凍感受性に関する比較解析

計 20 株の鶏由来 *C. jejuni* 株を対象として、それぞれ約 10^7 CFU/g（平均 $1.2E+07$ ）となるよう、鶏挽肉に接種し、冷凍 2 日後及び 7 日後の培養菌数を

比較した。結果として、冷凍 2 日後における各菌株の平均生存菌数は、 $2.0E+06 \pm 1.04E+06$ CFU/g（ $5.9E+05 \sim 4.4E+06$ CFU/g）、冷凍 7 日後の平均生存菌数は、 $9.8E+05 \pm 5.7E+05$ CFU/g（ $1.8E+05 \sim 3.0E+06$ CFU/g）であった（図 2）。接種菌数に対する F 値は、冷凍 2 日後および 7 日後でそれぞれ 0.686 および 0.004 であり、冷凍 2 日後の数値は、冷凍 7 日後のものに比べて、菌株間でのばらつきが拡大傾向にあることが明らかとなった。

以上より、冷凍処理に伴う鶏肉内カンピロバクターの菌数低減は、菌株間の差異が 2 日処理により顕著に顕れることが明らかとなった。

D. 考察

国内外を問わず、カンピロバクターの鶏肉汚染は、ヒトの食中毒と高い関連性を示すことが疫学的にあきらかになりつつある。諸外国で既に実施されている冷凍処理に関しては、実用性の点から最も現実的な応用対策と想定されるが、一方で、本菌の細菌学的性状として、冷凍等の環境ストレスに伴う生存性と培養性の乖離も懸念される。こうした背景をもとに、本研究では、昨年度実施した、冷凍処理に伴う鶏肉内での生存菌数変動に関する結果を軸として、冷凍処理を通じた生存性挙動を EMA-PCR 法を用いて検証することとした。本法による成績が、冷凍初期段階における培養成績との差異を示したことは、本菌が冷凍初期段階において、損傷あるいは生きていないが培養できない状態（VBNC）状態に移行していると推察される。後者の定義は、培養できないが、何らかの生理活性を有し、何らかの刺激に伴い、再び培養可能な状態へと復帰することとされているが、冷凍処理に伴う上述の成績の差異を鑑みて、今後、復帰の可能性についても検討する必要があると考える。

応用的側面から言及した場合、低減に資するため

には、こうした損傷や VBNC 状態にある細菌亜集団の可能性を除外する必要があると考えられ、そのためには冷凍処理時間の長期化（少なくとも 3 日以上）をはかる必要がある。

国内の生鶏肉に比べて、輸入冷凍鶏肉ではカンピロバクターの生存菌数は総じて低いとされている。想定される主要因としては、輸入時の冷凍処理により本菌の多くが培養性を低下させたためと考えられるが、それらの生存性については明らかな知見がない。来年度は、輸入冷凍鶏肉と国内流通生鶏肉の間でのカンピロバクター汚染実態を、培養性と生存性の両面から比較・検証することで、冷凍処理の応用的有効性を更に精査していきたい。

E. 結論

本分担研究では国内の生鶏挽肉を用いて、カンピロバクター (*C. jejuni*) の生存性の挙動を EMA-PCR 法を用いて検証し、培養成績との比較を行った。概して、本菌の生存性は培養成績と関連性を認めたが、冷凍初期段階（2日冷凍）では、統計学的に有意差を認め、より長時間の冷凍処理が生存性・培養性の両面からの微生物危害を想定する上で、必要と考えられた。更に、冷凍抵抗性の菌株間差異は、2日間冷凍時に比べ、7日冷凍時でより減少することが実証され、幅広い菌株を対象とした冷凍処理による鶏肉汚染低減をはかるためには、同様に一定時間以上の冷凍処理が有効であることが示された。

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, Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S. (2013) Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of *Campylobacter jejuni* ST-4526 and ST-4253 in Japan. J Appl Microbiol. 114(5): 1529-1538.

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

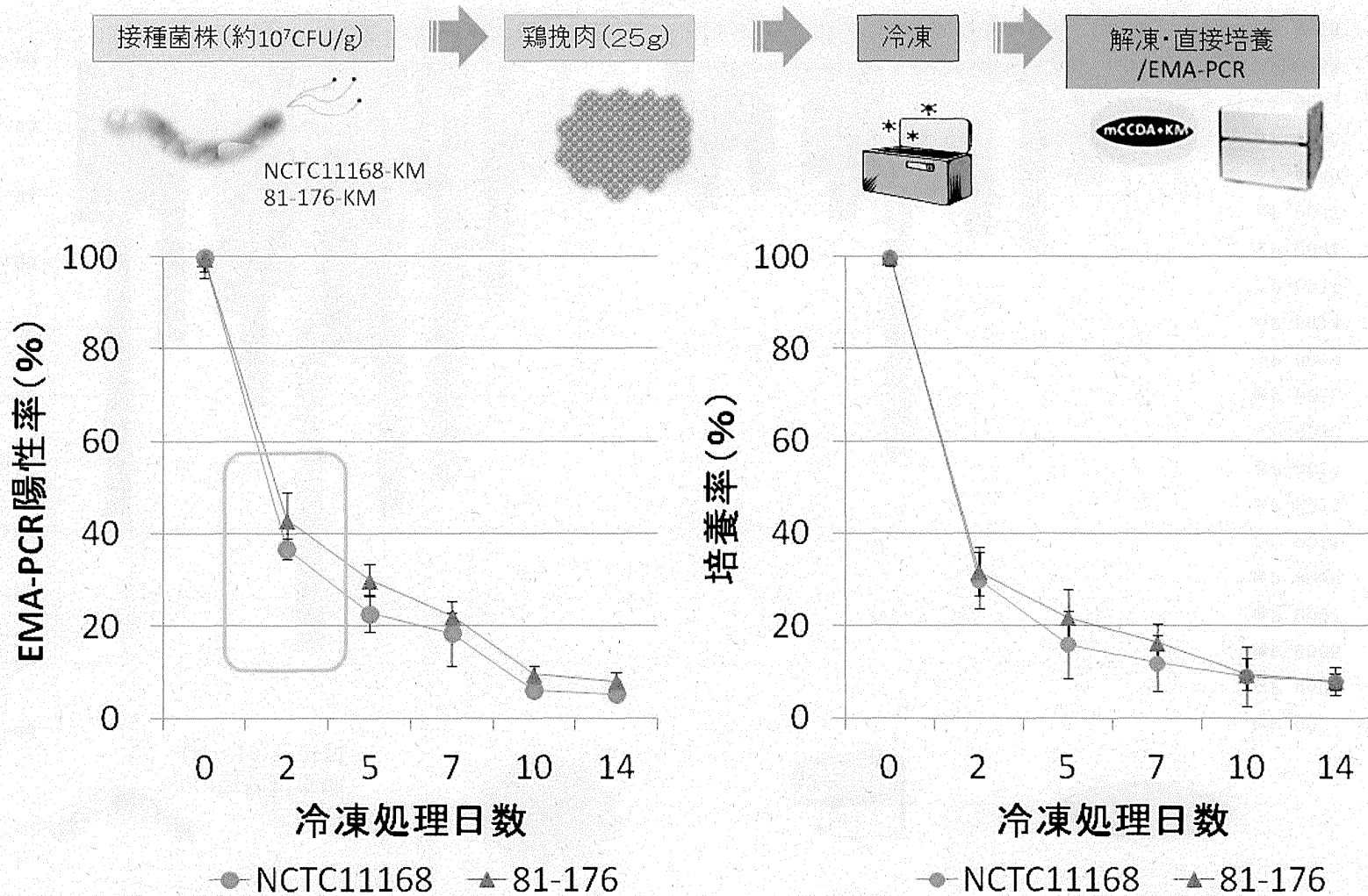
2. 実用新案登録

なし

3. その他

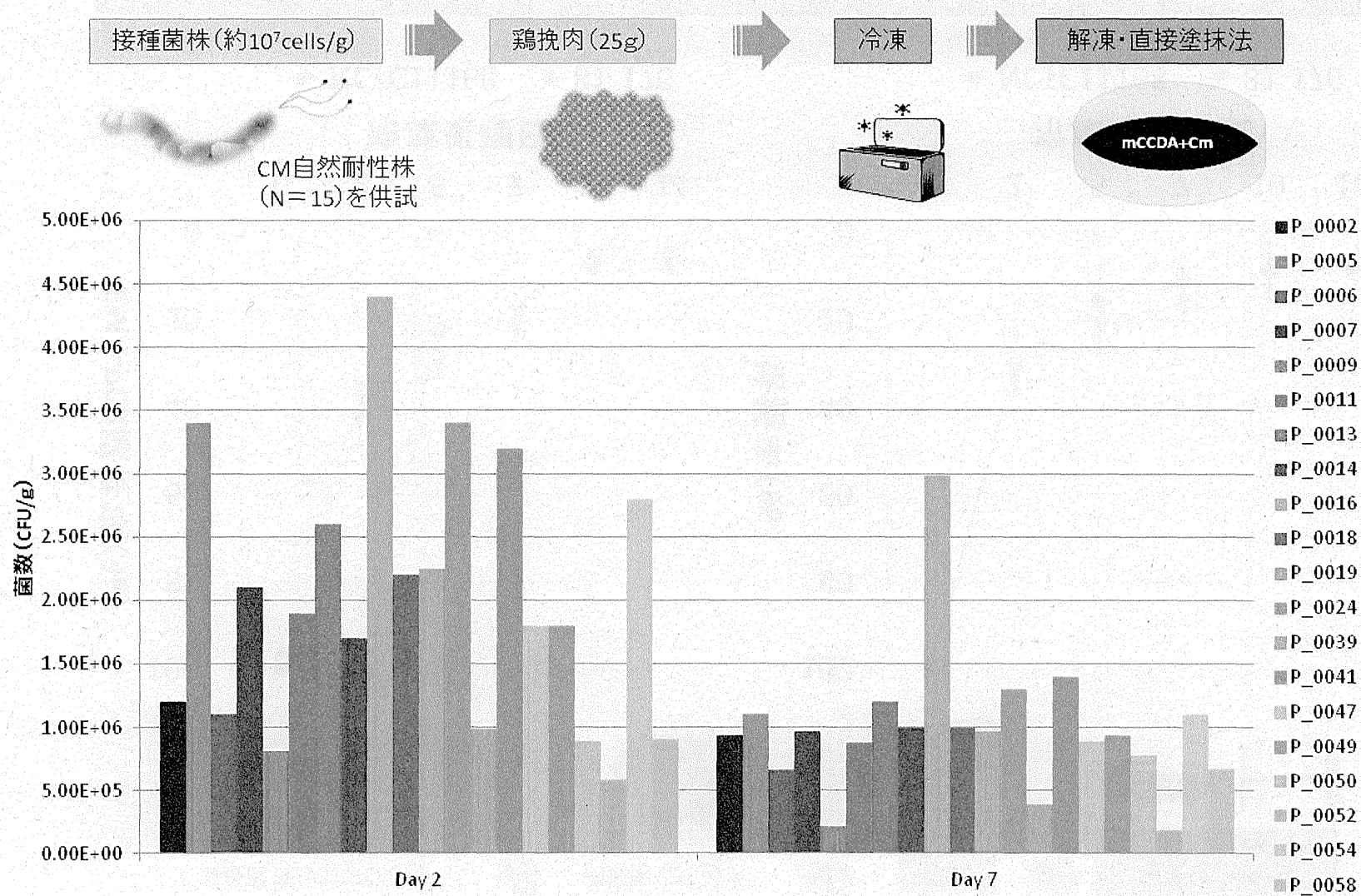
なし

図1. EMA-PCR法による鶏肉内*C. jejuni*の生存性に関する検討



冷凍初期には、EMA-PCR法・培養法の数値に有意差を認めた

図2. *C. jejuni*菌株間における冷凍感受性の比較



平成25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

「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」

分担研究報告書

牛内臓肉の衛生管理に関する研究

研究分担者 山本茂貴 東海大学 海洋学部 水産学科

研究要旨

牛内臓肉衛生管理の中での衛生管理に関する研究はほとんど行われていない。牛の腸管内には腸管出血性大腸菌を初めとする食中毒菌が存在しており、食肉処理段階での交差汚染（2次汚染）がこれまでも重要な食品汚染要因として挙げられている。本研究では、こうした腸管からの2次汚染を防ぐことを目的として、牛内臓処理施設の衛生管理に関する検討を行った。平成25年度は、全国8か所の食肉衛生検査所の協力の下、内臓処理施設及び第1胃から第4胃、小腸、大腸を対象として、糞便汚染指標細菌の定量検出を行うと共に、最終洗浄の前後における菌数変動について施設間で比較・検討した。その結果、十分量の洗浄水の確保と頻繁な交換により、生菌数として1log程度の低減をはかることができることが明らかとなった。今後は衛生状態のよい処理施設の方法を参考としつつ、マニュアル化するための検討を行う必要がある。

研究協力者

横山智子 北海道早来食肉衛生検査所
齋藤伸明 岩手県食肉衛生検査所
岡野 純 宮城県食肉衛生検査所
原 稔美 静岡県西部食肉衛生検査所
坂江 博 兵庫県食肉衛生検査センター
水谷恵子 鳥取県食肉衛生検査所
出光賢也 宮崎都濃食肉衛生検査所
宮良当一郎 沖縄県中央食肉衛生検査所
品川邦汎 岩手大学

A. 研究目的

本研究は、内臓肉の処理工程における細菌汚染状況を複数の施設で調査・比較

することにより、内臓処理施設の衛生管理のポイントを特定することを目的とした。

B. 研究方法

全国8か所の食肉衛生検査所の協力の下、内臓処理後の第1-4胃、小腸、大腸について生菌数、大腸菌、大腸菌群数を調査した。調査にあたっては、昨年度の成果を元に洗浄水の情報を収集し、対策の取れる施設では、その有効性を菌数の低減を指標として評価することとした。施設Aにおける検査方法をその一例として、図中に示したので参照されたい。

C. 研究結果

小腸、大腸ともに一般生菌数は 10^3 から 10^6 CFU/g の範囲であった。前年度と同様に施設間での汚染度には差異が認められ、生菌数としては、 10^3 CFU/g 程度の差が認められた。

最終洗浄処理の前後においては、平均して 1log 程度の生菌数の減少が認められたが、洗浄槽の水を頻繁に交換できない施設においては、最終洗浄前後で菌数の減少を認めなかった。

D. 考察

内臓肉の細菌汚染状況から処理施設により汚染菌数の高いところと低いところがあることがわかった。今後は汚染の低いところでのやり方をより詳細に検討する必要がある。また、そのやり方を汚染菌数の高い処理場に適用することを検討する必要があると考えられた。

E. 結論

牛内臓肉における汚染指標菌数の高低が処理施設間で認められた。内臓肉の衛生管理を向上させるためには、汚染菌数の低い処理施設での手順をマニュアル化する必要がある。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

・Asakura H, Masuda K, Yamamoto S, Igimi S. (2014) Molecular approach for tracing

dissemination routes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in bovine offal at slaughter. BioMed Research International. 2014: e

H. 知的財産権取得状況

該当なし

平成24年度 結果のまとめ

- 食用として処理される内臓は第一胃から結腸まで平均して $10^4 \sim 10^5$ cfu/gのオーダーであったが、8ヶ所の内1ヶ所は平均より1/10低く、1ヶ所は10倍高かった
- 菌数が低い畜場は対米と畜場であった

結果のまとめ

- 生菌数は $10^4 \sim <10^5$ cfu/g中心として分布
- Gと畜場は $10^3 \sim <10^4$ cfu/gと1オーダー低かった
- Cと畜場は $>10^5$ cfu/gのものが多かった
- 大腸菌群および大腸菌は $10^3 \sim <10^4$ cfu/gを中心として分布、はそれより1-2オーダー低かった
- 対米と畜場での管理の要点
- Cと畜場での管理のあり方

内臓処理の管理ポイント

アンケートから

- 処理のポイントを考える
- 1頭ごとに流水 貯め水
- まな板に内容物がでないようにする
- 小腸、大腸、胃をまとめて処理(Gと畜場)
 - 最終洗浄までの回数
- 脂肪をとったあと切開する
- 温湯(岩手0-50°C、沖縄40°C)
- 静岡(小腸大腸の分離作業台を1頭ごとに熱湯洗浄、かならずではない)

工程の考え方

- 内容物の除去 ホース、水槽内での切開
- 脂肪の除去、まな板での除去、水槽に浮かべ除去
- 菌を減らす工程
 - 水洗による菌の減少、粘膜面と漿膜面の汚染状況
- 衛生教育
 - 衛生意識の向上
 - 食品として考えられるか
 - 対象となる業者(複数業者がいる場合)
- (焼き肉)モツによる食中毒の現状
- モツの経済価値 利益率が減少、需要の減少

衛生管理のポイント

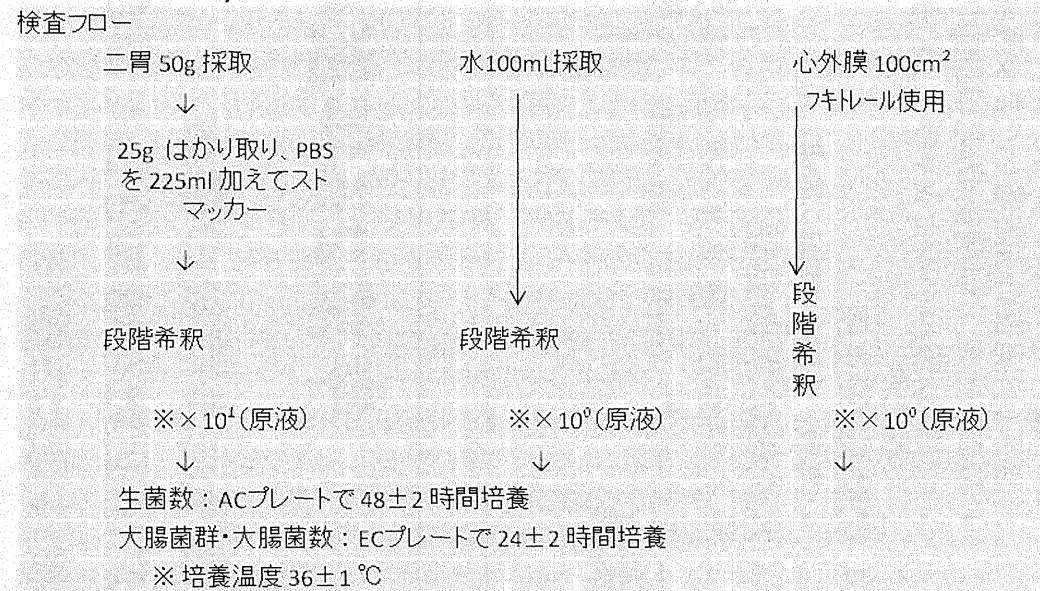
- 小腸
 - 切開機を使用
 - 北海道（切開後の腸をざるで再洗浄）
 - 岩手（切開後の腸を巻いたまま再洗浄、
 - 静岡、兵庫（切開後の腸に切開中の水がかかる）
 - 宮崎（切開中の腸にシャワー、氷冷後に同一牛の大小腸を流水で再洗浄）
 - 切開機未使用
 - 鳥取、沖縄、（宮城、不明）
 - 水洗後の水の処理
 - 水洗の回数、使用水（水道、井戸水）
 - 水の汚れ（濁度計、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数）
- 大腸

平成25年度の対応

- 最終洗浄前後の菌数
- 洗浄回数を増加させた場合の菌数
- 検体数は5検体
- 試験法はペトリフィルム（AC,EC）

施設Aでの検査フロー

- 水洗回数を増やす(水の汚染状態の調査)
- 最終製品と中間製品の比較



施設 A (第二胃を調査対象)

検 体	生菌数	大腸菌群数	大腸菌数
二胃 通常	5.2×10^5	5.2×10^3	4.6×10^3
二胃 洗浄	7.5×10^4	1.4×10^3	8.7×10^2

洗浄水	生菌数	大腸菌群数	大腸菌数
二胃 洗浄水	2.8×10^3	6.2×10	5.4×10
二胃 再洗浄水	7.4×10^3	6.1×10	5.4×10

n = 5, 単位はcfu/g

施設 G (汚染度が最も低い施設)

洗浄前後の第二胃、小・大腸の菌数と
洗浄後の洗浄水の菌数を比較

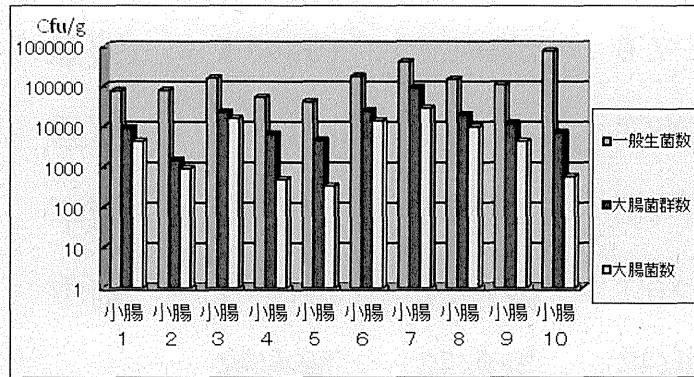
	生菌数	大腸菌群数	大腸菌数
二 胃			
洗浄前	1.5×10^5	4.1×10^2	8.9×10^2
洗浄後	2.5×10^4	2.2×10	1.1×10^2
小腸			
洗浄前	7.9×10^3	3.2×10^2	3.2×10^2
洗浄後	1.5×10^3	6.6×10	7.4
大腸			
洗浄前	1.9×10^4	1.7×10^3	2.0×10^3
洗浄後	4.9×10^3	5.1×10^2	1.1×10^3
洗浄後洗浄水	1.2×10^3	7.6×10	3.6×10

n=5, (cfu/g)

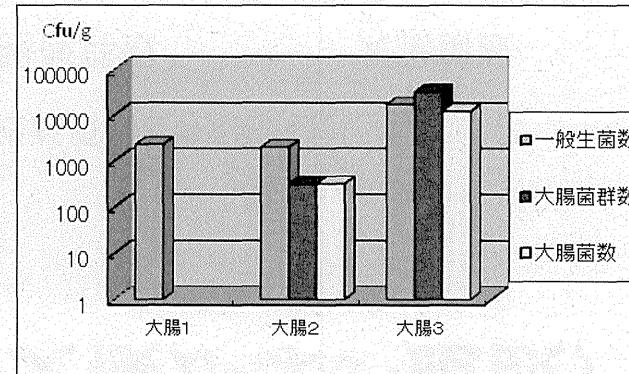
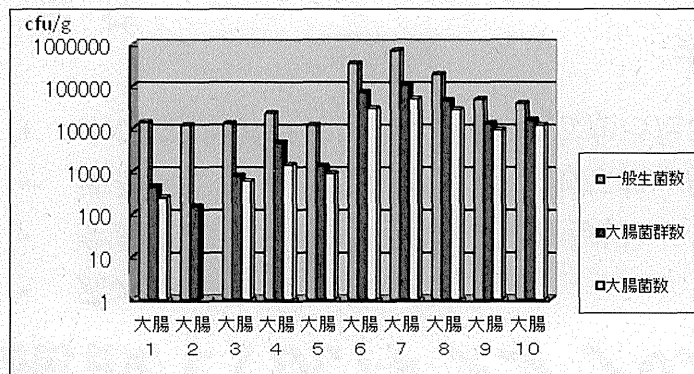
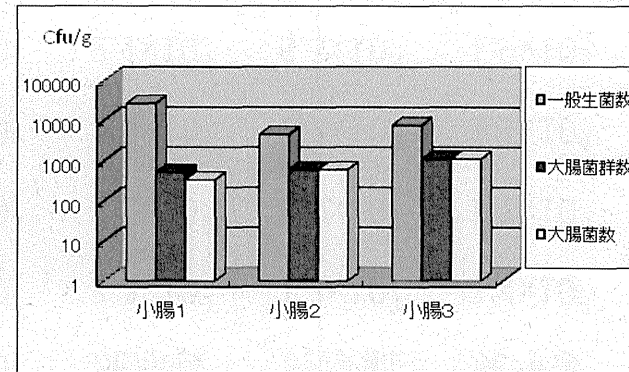
施設 D (小大腸を調査改善対象)

- 小腸、大腸の洗浄工程を増加
- 胃については変更できず

H24年度



H25年度



施設 E (洗浄タンクの交換がない施設)

- 流水でオーバーフロー
- 全頭終了までタンクの水は抜かない
- 洗浄前と洗浄後で菌数に差は出なかった
- 水の交換が十分に行われていなかったことが原因と考えられた

検 体	生菌数		大腸菌群数		大腸菌数	
	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後
小腸	1.4×10^4	3.0×10^4	1.9×10^3	3.2×10^3	1.3×10^3	2.4×10^3
大腸	1.2×10^4	9.5×10^4	3.1×10^3	3.2×10^3	2.9×10^3	1.7×10^3
盲腸	3.6×10^4	6.6×10^4	1.8×10^4	1.3×10^4	1.7×10^4	1.1×10^4
直腸	3.2×10^4	2.2×10^4	6.7×10^3	2.1×10^3	6.3×10^3	1.9×10^3
二胃	4.0×10^5	3.0×10^5	2.7×10^4	1.7×10^4	2.5×10^4	1.6×10^4
三胃	8.4×10^4	1.5×10^5	2.6×10^3	3.0×10^3	2.5×10^3	2.2×10^3
四胃	7.6×10^4	1.5×10^5	3.4×10^3	2.0×10^3	2.6×10^3	1.4×10^3

平成25年度 まとめ

- ◆ 今後、菌数の低かった施設および高かった施設においてどのような処理がなされているかを調査し、菌数が高かった施設と比較することにより、対策を検討する事とした。
- ◆ アンケート調査に基づく改善点として、洗浄水槽の水替えの回数を増やすこと等が応用可能な対策と想定された。
- ◆ 洗浄方法の施設間の違い等に焦点をあてた実証調査を通じて、洗浄前後で約1logの生菌数の減少が洗浄水の量を十分に確保し、交換することで実現可能であることが示された。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Pascoe B, Lappin-Scott H, Sheppard S K, <u>Asakura H</u>	Does biofilm formation aid colonization and infection in <i>Campylobacter</i> ?	Sheppard SK & Meric G	<i>Campylobacter</i> Ecology and Evolution	Caister Academic Press	London, UK	2014	In press.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
<u>Asakura H</u> , Hashii N, Uema M, Kawasaki N, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yamamoto S.	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>pxdA</i> affects flagellum-mediated motility to alter host colonization.	PLoS ONE.	8	e70418	2013
<u>Asakura H</u> , Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S.	Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of <i>Campylobacter jejuni</i> ST-4526 and ST-4253 in Japan.	J Appl Microbiol.	114	1529-1538	2013
<u>Asakura H</u> , Masuda K, Yamamoto S, Igimi S.	Molecular approach for tracing the dissemination routes of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in bovine offal at slaughter.	BioMed Res Int.	2014	e39139	2014
<u>Asakura H</u> , Brueggemann H, Makino S, Sugita-Konishi Y.	Molecular approaches for the classification of microbial pathogens of public health significance.	BioMed Res Int.	2014	e725801	2014

