

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
総括研究報告書

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

研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨：本研究は、(1)と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化、(2)食鳥肉のカンピロバクター等の制御、(3)牛内蔵肉の衛生管理、に関する微生物リスク管理に関わる基礎・応用的知見の集積を通じて、食肉の衛生を確保するための施策に貢献する研究である。本年度は、主にカンピロバクターの制御に関する研究を、農場・食鳥処理・流通の各過程で展開させ、細菌制御に関して、以下の知見を得ることができた。

農場段階では、東北・九州地方の養鶏農場の協力を得て、カンピロバクターの農場汚染実態を調査した。東北地方の6農場・59鶏舎のうち、83.1% (49鶏舎)よりカンピロバクターが分離された。MLST法による遺伝子型別により、農場毎に蔓延を顕す遺伝子型の相違を確認した。その結果、一部の農場では単一の遺伝子型のみが蔓延する状況が把握された。鶏舎毎の分布の精査により、作業員動線下流にあたる鶏舎では上流域の鶏舎に比べ、鶏舎あたりの検出率が高い傾向が見られた。また、複数の遺伝子型が見られた農場の一部では作業員の動線下流に位置する鶏舎で検出された遺伝子型構成が上流鶏舎に比べて単純化する傾向が認められた。これらの成績より、カンピロバクターの鶏舎間水平伝播は、動線に伴った動態を示すと共に、遺伝子型により異なる伝播力を有することが示唆された。九州地方の清浄度の高い農場を対象とした環境調査では、当該農場の環境からカンピロバクターは殆ど検出されない状況を確認した。また、ブロイラー鶏の保菌状況を日齢を追って調査し、31日齢より検出される状況が確認された。更に、持続的にカンピロバクターが検出される農場を対象として、飼養される鶏由来株の遺伝子型別をMLST法により判定し、カンピロバクターによる持続的農場汚染は必ずしも同一菌株の常在化に因るものではないことを明らかにした。

食鳥処理段階では、カンピロバクター保菌鶏が食鳥処理場で処理されると、同と体を汚染するとともに、施設を汚染し、その汚染が次に処理する非保菌鶏のと体を交差汚染することが分離株のPCR-RFLP遺伝子型別手法を通じて実証された。鶏肉へのカンピロバクター汚染を無くすためには非保菌鶏群を保菌鶏に先行して処理に供する、いわゆる区分処理が食鳥処理過程を通じた交差汚染の防止に有効であることが確認された。

流通段階では、前年度の成績より想定された、冷凍処理による鶏肉内カンピロバクターの低減効果を別機関でも実施し、同等の効果を再検証した。また、冷凍処理に伴う生存性と培養性の挙動をEMA-PCR法と培養法を用いて比較検証し、同処理の初期段階では、生存率が培養率を上回る成績を得たため、損傷或いはVBNC化した菌体の亜集団の存在が想定された。また、計20株を用いて冷凍感受性を比較したところ、2日間の冷凍処理で認められた菌株間の培養性の差異は、処理7日後に比べて有意に高く、鶏肉汚染低減を目的とした冷凍処理を行うにあたっては一定以上の処理時間が必要と考えられた。市販食肉の汚染調査として、*C. jejuni*は42% (11/26検体)の市販鶏モモ肉及び40% (12/30検体)の鶏ムネ肉、6% (2/31検体)の鶏ササミから分離されたが、牛スライス肉(20検体)および豚スライス肉(22検体)からは分離されず、食肉の中では、鶏肉がカンピロバクター食中毒の主たる感染源となりうるということが再確認された。

牛内蔵肉の衛生管理に関する研究としては、全国8か所の食肉衛生検査所の協力の下、内臓処理施設および第一胃から第四胃、小腸、大腸を対象に、糞便汚染指標菌の定量検出を行うと共に、検体の最終洗浄前後における菌数変動を施設間で比較検討した。結果として、十分量の洗浄水の確保およびその頻繁な交換を実施している施設では、洗浄後検体の低い汚染菌数が認められた。今後は衛生状態の良い処理施設の方法を参考としつつ、マニュアル化に向けた検討を行う必要があると考えられた。

研究分担者

山本 茂貴 (東海大学 海洋学部)
森田 幸雄 (東京家政大学 家政学部)
中馬 猛久 (鹿児島大学 共同獣医学部)

協力研究者

石岡 大成 国立感染症研究所
遠藤 健太郎 群馬県食肉衛生検査所
岡野 純 宮城県食肉衛生検査所
木村 博一 国立感染症研究所
小畑 敏 群馬県食肉衛生検査所
古茂田 恵美子 東京家政大学
川原 俊介 MP アグロ株式会社
川本 恵子 帯広畜産大学
倉園 久生 帯広畜産大学
齋藤 伸明 岩手県食肉衛生検査所
坂江 博 兵庫県食肉衛生検査センター
重村 泰毅 東京家政大学
品川 邦汎 岩手大学
鈴木 智之 滋賀県衛生科学センター
茶園 明 NPO 法人日本食品安全検証機構
出光 賢也 宮崎都濃食肉衛生検査所
原 稔美 静岡県西部食肉衛生検査所
藤田 雅弘 群馬県食肉衛生検査所
松田 錦弥 群馬県食肉衛生検査所
宮良 当一郎 沖縄県中央食肉衛生検査所
水谷 恵子 鳥取県食肉衛生検査所
水谷 昌代 群馬県食肉衛生検査所
渡辺 邦雄 共立製薬(株)
渡 昭博 群馬県食肉衛生検査所
横山 智子 北海道早来食肉衛生検査所
梶田 和彌 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

本研究は食肉の衛生を確保するための施策に貢献する研究であり、1. 食鳥肉のカンピロバクターの制御に関する研究、2. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究、3. とちく・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究、から構成される。

1. 食鳥肉のカンピロバクター制御に関する研究

現在、細菌性食中毒の中で発生件数が最も多いのがカンピロバクター食中毒である。これまでのカンピロバクター制御に関する研究は、食鳥処理場での対策を中心に行われてきた。本研究では、農場から食卓に至るフードチェーンを通して、カンピロバクター食中毒の制御のための研究を行うことを特色として、検討内容を以下の3項目に大別した。(1) 農場での衛生対策ポイントの検討：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。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手法により検討する。(2) 食鳥処理場での衛生対策：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検討する。(3) 流通段階：冷凍等応用的処理によるカンピロバクターの低減効果に着目し、関連文献を収集すると共に、条件抽出を行い、実験的に検証する。また、同処理により発生が予想される、損傷状態に関する実験的知見を得ることで、ヒト健康危害性を踏まえた当該菌の制御効果を考察する。市販流通鶏肉の汚染状況を調査する。

2. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

牛内臓肉衛生管理の中でも腸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はじめとする複数の食中毒菌が存在しており、それらの2次汚染を防ぐために牛内臓処理施設の衛生管理に関する研究を行うことを目的とする。

3. と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

食肉衛生検査は、疾病排除を主体としてヒト健康危害を防止する意義を有する。本研究では、疾病診断技術についての議論を深め、標準化に向けた取り組みを行うことで、全国で同一レベルの食肉検査実施が可能となることが期待される。本研究では実務者間で意見交換を行い、診断基準が明確でない疾病を選定し、それらの診断基準に関する情報を収集することを目的としたが、疾病診断の標準化について緊急性は低いという意見が実務者の大勢として把握されたため、本年度は検討項目としていない。

B. 研究方法

1. 農場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

1) 東北地方の協力農場とサンプリング

平成25年8月-9月の間に、東北地方にある養鶏場計10農場の協力を得て、同農場内で養鶏に供されていた計98鶏舎を対象として、出荷時に残存していた盲腸内容物計242検体をシードスワブ(ニッスイ)を用いて採取し、冷蔵温度帯で輸送した。輸送は通常、翌日配送であったが、一部検体では交通遅延等により、翌々日の配送となった。

2) 九州地方の協力農場とサンプリング

九州地方の養鶏農場の協力を得て、ブロイラー鶏の日齢に応じて、以下の検体を採取した。 飼料、斃死雞遺残卵黄、 飲用水原水、 貯水槽、 飲

用水鶏舎内(手前、中央、奥の計3か所)、 堆積糞、 盲腸便、 野鳥糞便、 ネズミ糞便、 鶏舎前長靴底面。

2) 分離培養および各種検出法

シードスワブ検体は、到着後速やかに1mlの滅菌リン酸緩衝液(PBS、pH7.4)に懸濁し、以下の試験に供した。

2.1) 分離培養法

上記懸濁液0.3mlを10mlのプレストン増菌培地(Oxoid)に接種し、24時間、42°Cにて微好気培養した。その後、1白金耳容量をmCCDA寒天培地(栄研化学)に塗布し、42°Cにて24-48時間培養した。出現集落の中で、疑わしいものについては、Cycleave PCR *Campylobacter (jejuni/coli)* Typing kit(タカラバイオ)を用いたリアルタイムPCR法により菌種の同定試験を行った。

2.2.) リアルタイムPCR法

上記懸濁液0.3mlを21,500 x g、5分間遠心分離し、得られた沈査を50ulのPrepMan Ultra(Life Technologies)に再懸濁した。95°Cで10分間加熱した後、1μlを鋳型DNAとして、Cycleave PCR *Campylobacter (jejuni/coli)* Typing kit(タカラバイオ)を用いたリアルタイムPCR法をLight Cycler 480(ロッシュ)にて実施した。本装置における陽性・陰性判定は、LC480 GeneScanningソフトウェア(ロッシュ)を通じて行った。

2.3.) イムノクロマト

上記懸濁液0.1mlをNHイムノクロマトカンピロバクター(日本ハム)に供した。判定は、製品の添付指示書に従った。

2.4) 九州の農場環境由来検体からの分離培養

水系検体については、検体5mlに対し、2倍濃厚Preston培地5mlを加え、42Cで48時間培養した。飼料検体については、検体10gに対し、Preston培地90mlを加え、同様に培養に供した。上述の

Preston 培養液は、いずれもその後 mCCDA 培地に塗抹し、42℃ で 48 時間培養した後、疑わしい集落が認められた場合には Mueller-Hinton 培地に画線培養を行い、分離株の同定へと供することとした。ふき取り検体については、シードスワブを mCCDA 培地に直接塗抹し、同様の扱いとした。また、飼料および水系検体については、並行して mCCDA 培地を用いた直接培養も実施した。

3) MLST 解析

分離菌株より、DNeasy kit (キアゲン) を用いて全 DNA を抽出した後、*Campylobacter* MLST database

(<http://www.pubmlst.org/campylobacter>)

上のガイドラインに従い、PCR 反応およびサイクルシーケンス反応を実施した。得られた配列情報は、CLC Main workbench + MLST module (CLC Bio) を用いて、アセンブルした後、上記データベース上の登録情報との参照を通じて、各菌株の遺伝子型を決定した。

4) 農場情報の収集

供試農場における、作業員動線・鶏舎配置図・消毒槽配置・鶏舎形態・親鶏ロット等の情報について、各農場を管轄する親会社を通じて収集した。各農場配置図に、カンピロバクター分布とその遺伝性状、作業員動線、親鶏ロット等の情報を識別できるよう加えた。

2. 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

1) 食鳥処理場でのカンピロバクター汚染調査

a) 農場でのアンケート調査

平成 23 年の調査により判明したカンピロバクター保菌農場と非保菌農場の計 15 農場を対象に、鶏舎構造および飼養管理に関する 61 項目の質問票を配布し、回答を得た後、解析した。

b) 搬入鶏の盲腸便と「と体」の拭き取り検査および分離株の PCR-RFLP 法による遺伝子型

搬入鶏の盲腸便およびと体の拭き取り検査: 搬入鶏の盲腸便と、と体の拭き取り検査は、2012 年 5 月に 4 回(5 月 10 日, 14 日, 24 日, 31 日), 7 月に 3 回(7 月 10 日, 17 日, 26 日)および 10 月に 2 回(10 月 16 日, 30 日), 計 9 回実施した。鶏の盲腸便はロット毎に 5 羽ずつ採取した。検体 1g を 10 倍量の Preston ブイヨン (Oxoid) で 42℃, 24 時間, 微好気培養後, Butzler agar (Oxoid) および mCCDA (Oxoid) を用いて 42℃, 48 時間, 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。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 (ピオメリユ) により同定した。また, klena の方法に従い multiplex-PCR による菌種同定をおこなった。

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行った。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) のと体を採材した。同一ロットのと体 3 羽の胸部 (25cm² × 3) を滅菌ガーゼで拭き取り, 30ml の PBS に浮遊させた。2 倍濃度 Preston ブイヨンに等量の拭き取り液を加えて, 42℃, 24 時間, 微好気培養後, mCCDA, Butzler agar に塗抹し 42℃, 48 時間, 微好気培養をおこなった。分離平板上に生じた疑わしいコロニーについては盲腸内容からの分離菌と同様に菌種同定のため multiplex-PCR を実施後, 市販血清による血清型別をおこなった。

PCR-RFLP 法による分離菌株の遺伝子型別法: 盲

腸便およびふき取り検体から分離されたカンピロバクターは PCR-RFLP 法により遺伝子型別を実施した。PCR により Wassenaar らのプライマーを用いて *flagellin A* 遺伝子を増幅後、Nachamkin らの方法に準拠し、PCR 産物を *Dde I* (Roch) および *Hinf I* (Roch) で切断し、切断パターンを観察した。

2) 凍結処理によるカンピロバクターの減少効果

汚染鶏肉の対策として欧州では凍結処理が義務づけられているが、凍結処理の効果を定量的な検査により迅速に評価する必要がある。そこで試験菌液の調整は、供試菌株として *C. jejuni* (ATCC43430)を用いた。凍結処理の効果を検討するため、鶏肉 1g あたり 8.0×10^7 cfu/ml の試験菌液を 1ml 接種し、10 倍量の Preston ブイオンを加え、4、-20、-80 で静置した後、経時的に生菌数を測定した。菌数の測定は、Butzler 寒天培地を用いた平板希釈法を用いた。

3) 市販牛・豚・鶏肉のカンピロバクター汚染調査

2013 年 4 月から 2014 年 2 月の間に東京・埼玉・茨城・千葉県・群馬県の食肉販売店 31 店舗から牛スライス肉を 20 検体、豚スライス肉 22 検体、鶏モモ肉(鶏皮付)26 検体、鶏ムネ肉(鶏皮付)30 検体、鶏ササミ 31 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 、 25 ± 1 時間、微好気条件下(80% N_2 、10% CO_2 、5% O_2 、5% H_2)で増菌培養後、Butzler agar および mCCDA に塗抹し、 42 ± 1 、 48 ± 2 時間、微好気培養した。各分離培地上のカンピロバクターを疑う乳白色露滴状集落を 1~3 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-Matsune が報告した PCR 法を用いて菌種の同定を行った。

3. 流通段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

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、滅菌ストマックカー袋に分取した。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、 $-20^\circ C$ 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 $\mu g/ml$) 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 Fukushima 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。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

全国 8 カ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、対策の取れる施設を選定した上で、対応策の有効性を菌数変動を指標として評価することとした。施設 A における検査方法の一例として、図中に示したので参照されたい。

C. 研究成果

1. 農場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

1) 農場でのカンピロバクター分離・検出成績と迅速検査法との関連性

平成 25 年 8 月~9 月の間に、東北地方の養鶏農場計 10 か所の協力を得て、当該施設内の計 98 鶏舎より、各 1~3 検体の盲腸内容を採用し(計 242 検体)カンピロバクター・ジェジュニおよびコリ(以下、*C. jejuni* 又は *C. coli*) の分離・検出を試みた。分離培養により、4 農場由来の検体ではほぼ全

てで陰性となったが、その多くは採取量が相対的に少ない場合や、配送に 2 日以上を要した場合等が多く認められた。それ以外の 6 農場(A-F)由来の 152 検体については、合計で 69.7% (106 検体/152 検体) の分離陽性率を示した。また、全ての検体については、同時に遺伝子あるいは抗原の迅速検出にも供したが、特に、上述の 6 農場由来検体での成績は、分離の有無に関わらず、遺伝子検出法で 98.0% (149 検体/152 検体)、イムノクロマト法でも 97.4% (148 検体/152 検体) の陽性率を示した。以上より、供試農場で飼養されるブロイラー鶏の多くはカンピロバクターを保菌している実態が明らかになると共に、迅速簡便検査法であるイムノクロマトは遺伝子検査法と同程度の検出成績を示すことが明らかとなった。

2) 農場間・鶏舎別での鶏舎分離陽性率の比較

A-F の 6 農場間での、平均鶏舎陽性率は 69.7% であり、最も高い数値を示した A および C 農場では 83.3%、最も低い数値を示した F 農場の陽性率は 50.0% であった。しかしながら、F 農場からの検体採取にあたっては、鶏舎あたり 1 検体のみを採取していたことから、他農場に比べて低い数値となったと考えられた。

鶏舎単位での陽性率を農場別に比較したところ、平均陽性率は 79.7% で、このうち農場 A, B, C では全ての鶏舎が陽性を示した。また、農場 D, E においても、同様にほぼ全ての鶏舎(8/9 鶏舎および 12/13 鶏舎)から本菌が分離されたが、農場 F での鶏舎陽性率は 50% (7/14 鶏舎) と他農場に比べて低い傾向を示した。以上、農場別・鶏舎別の分離成績の比較を通じて、検体のサンプリング数および関連性状等が分離成績の大きな決定要因となることが想定された。

3) 親鶏ロット別分離陽性率の比較

本研究で試験対象とした農場で飼養された鶏群

については、供給元が一部重複していたことから、次に親鶏ロット別の鶏舎陽性率を比較・調査することとした。表3に記したとおり、供試鶏舎で飼養された鶏群の親鶏は計12ロットから構成されており、このうち、5ロットでは100%陽性を示していた。中でも低い鶏舎陽性率を示したのは、No. 627やNo. 905、No.1010であったが(57.1%~66.6%)であったが、これらの陰性鶏舎には農場Fの成績が含まれていた。以上より、特定の親鶏からの垂直伝播を指し示す知見は得られず、垂直伝播が農場蔓延の主因とは考え難い状況を把握することができた。

4) 各農場における分離菌株の遺伝子型別と農場内伝播に関する知見

上記の知見を踏まえ、次に5農場(A-E)由来の計106株を対象として、MLST解析を実施すると共に、農場の施設・管理情報等を収集し、遺伝学的同一性を軸とした農場内伝播に関する知見の収集にあたった。農場CおよびEでは、単一の遺伝子型(以下ST)が農場内に認められた(C, ST-50; E, ST-4526)。両農場では、作業員が2つの動線で管理にあたっていたが、このうち、特に農場Eについては、鶏舎毎のST-4526分離頻度が動線の下流で高い傾向を示した。また、農場Dでは、何れの鶏舎にも踏み込み式の消毒槽が設置されていたが、ST-2031及びST-50が9鶏舎中8鶏舎より分離された。作業員の動線は同じく2系統であり、2動線間での顕著な差異は認められず、上流ではST-50、下流ではST-2031が主体となっている傾向が認められた。農場Aでは、一部二階建ての鶏舎を使用していた。本農場内からは、5鶏舎より3種のST(ST-50, ST-2031, ST-6704)を示す*C. jejuni*が分離された。農場Dと同様に、ST-50については作業員動線の上流に限定される傾向が認められた。農場Bでは、9鶏舎全てから*C. jejuni*が分離され、それらの遺伝子構成はST-50, ST-2031, ST-4526の3型であった。上述の農場A,D

と同様、ST-50は作業員動線上流に限定して認められた。また、本農場からは、*C. coli*も複数検出されたが、ST型については新規のものであった。

以上より、供試農場内に蔓延を示す*C. jejuni*は作業員の動線と一定の関連性を示すことが明らかとなったが、一部の遺伝子型(ST-50)株では、動線に沿った伝播を示し難い傾向も認められた。

5) 九州地方の農場内環境におけるカンピロバクター汚染状況

九州地方の養鶏農場内環境からのカンピロバクター検出を試みたところ、ブロイラー鶏が45日齢に生育した時点で、貯水槽および堆積糞から*C. coli*が検出されたが、その他の日齢の時点およびその他の検体は何れも陰性を示し、供試農場環境下ではカンピロバクターの常在化は生じていないことが推察された。

6) ブロイラー鶏の日齢に応じたカンピロバクター保菌変動

試験対象としたブロイラー鶏では、31日齢以降にカンピロバクターが分離されることが示された。

7) 持続汚染を顕す農場における*C. jejuni*菌株の遺伝学的多様性

年度毎に追跡した農場Aのブロイラー鶏からは、いずれも異なる遺伝子型の菌株が分離されていた。同様に、2年間に計5回のサンプリングを行った農場Bの検体では、ST-354は一定の継続性をもって検出された一方、ST-5265やST-4389等は散発性の検出に留まった。以上より、カンピロバクターの持続汚染を示した供試農場では、異なる遺伝子型の株が入れ替わって汚染を示す事例が複数認められ、鶏舎内の常在化に因る可能性は低いと考えられた。

2. 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

1) A食鳥処理場でのカンピロバクター汚染調査

a. 農場のアンケート調査結果

カンピロバクター保菌農場と非保菌農場の鶏舎構造および飼養管理等に関するアンケート調査を実施したところ、全ての農場がA食鳥処理場の直営のため、有意差が認められた調査項目はなかった。しかしながら、鶏舎の形態に注目したところ、ウインドレス鶏舎が開放鶏舎に比べ有意に検出数が低かった (Fisher の正確確率検定: $p=0.03$)。

b. 搬入鶏の盲腸便とと体の拭き取り検査および分離株の PCR-RFLP 法による遺伝子型

盲腸便およびと体の拭き取り液から分離されたカンピロバクターについて PCR-RFLP を行ったところ *Dde*I の切断パターンにより 10 パターン、*Hinf*I の切断パターンにより 5 パターンに類別された。この 2 つの制限酵素の組み合わせにより盲腸内容物は 14、拭き取り液は 12 の PCR-RFLP 遺伝子型に類別された。

盲腸便からカンピロバクターが検出されない (カンピロバクター非保菌鶏群)11 ロットのうち、9 ロットのと体からカンピロバクターは検出されなかった。カンピロバクターがと体から検出された 2 ロットのカンピロバクター非保菌鶏群(7月10日処理,ロットTYCおよび7月17日処理,ロットNGT2)はいずれも直前にカンピロバクター保菌鶏群を処理していた。また、PCR-RFLP 遺伝子型においても直前に処理したカンピロバクター保菌鶏群からの汚染であることが判明した。盲腸便からカンピロバクターが検出された(カンピロバクター保菌鶏群)13 ロットの全てのと体からカンピロバクターが検出された。その 13 ロットのうち 11 ロットはと体と同じ PCR-RFLP 遺伝子型を盲腸便に保有していた。よって、先に処理されるカンピロバクター保菌鶏群から次の鶏群に二次汚染することが示唆された。逆に、カンピロバクター非保菌鶏群のみ処理することができれば、カンピロバクター汚染の無いと

体を生産できることが示唆された。

2) 凍結処理によるカンピロバクターの低減効果の再検証

鶏肉を -20 で保持した場合、2 時間後の生存菌数は 1.9×10^6 cfu/ml、24 時間後は 3.3×10^4 cfu/ml、48 時間後には 9.3×10^4 cfu/ml となった。-80 下での挙動は、2 時間後に 3.2×10^5 cfu/ml、24 時間後に 4.5×10^4 cfu/ml、48 時間後には 9.0×10^4 cfu/ml となり、冷凍下での保存により、鶏肉中のカンピロバクターの菌数は約 1/100 に低減することが確認された。

3) 市販牛・豚・鶏ひき肉のカンピロバクター汚染調査

カンピロバクターは 42% (11/26 検体) の鶏モモ肉、40% (12/30 検体) の鶏ムネ肉、6% (2/31 検体) の鶏ササミから分離され、分離菌は全て *C. jejuni* であった。一方で、牛スライス肉、豚スライス肉から本菌は分離されなかった。

3. 流通段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

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。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。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。

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* 菌株間での冷凍感受性比較解析

計 20 株の鶏由来 *C. jejuni* 株を対象に、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。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。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

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

1. 農場におけるカンピロバクターの制御に関する

研究～農場内伝播に関する研究～

本研究では、東北地方の養鶏農場におけるカンピロバクター汚染実態を把握すると共に、親鶏ロット別、農場別の鶏舎汚染率の比較より、供試農場での汚染が垂直伝播に因る可能性は必ずしも高くはないと考えられた。一方で、分離株の遺伝子型別を通じた検討により、農場内の各鶏舎には共通の遺伝子型株が分布している実態が明らかとなり、作業員の動線に沿った水平伝播が農場内蔓延の一要因と目された。

カンピロバクターの農場汚染については、これまでにデンマークをはじめとした欧米諸国で精力的に調査研究が進められ、伝播経路に関する様々な知見が集積されてきた：これまでに、衛生害虫、空気感染、作業員、野鳥、水、飼料、土壌、親鶏等が推定されている（参考文献 1-2）：Sommer らは、農場でのカンピロバクター汚染と統計学的に関連性を示す因子として、老朽化鶏舎、全粒小麦の飼料添加開始時期の遅れ、出荷時期の遅延、空気口が多数設置された鶏舎構造、げっ歯類の不適切管理等を挙げている（参考文献 1）。また、Hald らは、デンマークの農場周辺に棲息するハエの約 8.2%がカンピロバクターを保有していたことを報告しており（参考文献 2）、伝播要因として、その後着目されてきた。2006 年にデンマークの 20 農場ではハエ用防虫ネット設置によるカンピロバクターの鶏群汚染率に関する検討が行われ、同ネットの設置により、51.4%であった汚染率が 15.4%にまで低減したことが報告されている（参考文献 3）。更に、同国でのヒト・カンピロバクター感染者数は同設備の導入により 77%低減していることが報告されている（参考文献 3, 4）。本研究における対象農場ではいずれも開放鶏舎の形態をとっており、こうした対策を取ることで、一定の低減がはかられる可能性も示唆されるものの、一方で汚染経路が親鶏からの垂直

伝播であった場合には、飼養中のこうした取り組みは、農場内での根源的な制御には結びつかないことは容易に想定できる。更には、開放鶏舎の特性から、空気、多様な衛生害虫、ヒトや野生動物、野鳥等複数の要因が本菌伝播を介在する可能性は依然として否定できない。

本研究では、親ロット別に汚染率を調べると共に、分離株の遺伝学的相同性を検証することで、農場内での水平伝播が蔓延の主因であるとの見解を得た。また、水平伝播を構成する一推定要因として、作業員の動線に伴う同一遺伝子型菌株の複数鶏舎分布を根拠として、ヒトを介した伝播を挙げることができた。

～農場内侵入要因の探索と持続汚染に係る細菌学的研究～

本研究では、農場内環境におけるカンピロバクターの分布を検証したが、その多くは陰性を示し、これらがプロイラー鶏への汚染経路として常在的に機能していないことが想定された。しかしながら、本研究では、協力元でのサンプリング等の制約もあり、十分量の検体を分離培養に供したとは言い難い。従って、こうした環境検体が汚染経路となっていた可能性を否定することはできない。一方で、盲腸便の陰性結果は、供試農場におけるカンピロバクター汚染が低いであろうとの推察を供するものであり、今後は、汚染度の高い農場を対象とした上での環境評価が求められよう。更に、遺伝子検出法の併用も有効かもしれない。

また、カンピロバクターによる農場の持続汚染は、その後の食鳥処理段階において、非汚染農場より搬出される食鳥肉を交差汚染する要因ともなることから、その清浄化が求められよう。その意味で、必ずしも同一菌株の常在化が農場持続汚染の要因とはなっていないであろうとする本研究の知見は、対

象農場等、持続汚染を示す農場の清浄化対策が飼養管理等によっても達成しうる可能性を示唆しているといえよう。

2. 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

食鳥処理場での調査の結果、カンピロバクター非保菌鶏群のみを処理した場合はと体からカンピロバクターは検出されなかった。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でカンピロバクターの汚染は生じないことが判明した。一方、カンピロバクター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が分離され、直後に処理される非保菌鶏群のと体も汚染していた。分離株について PCR-RFLP 遺伝子型別をおこなったところ、その切断パターンから直前に処理された保菌鶏群の盲腸内容物由来株と同一の PCR-RFLP 遺伝子型を示すものが多く認められ、保菌鶏群の盲腸便中に生息するカンピロバクターが次に処理する鶏群のと体を交差汚染することが実証された。

搬入前の養鶏場段階でカンピロバクター非保菌鶏群であるか、保菌鶏群であるか判明することができ、さらに、食鳥処理場でカンピロバクター非保菌鶏を先に搬入し、処理するという、区分処理ができれば、カンピロバクター汚染の無い鶏肉を生産することが可能であると思われた。

カンピロバクターを保菌していない鶏舎の飼育管理状況を把握するため、アンケート調査を実施したが、すべてが直営農場であり、保菌農場と非保菌農場の衛生管理項目について大きな違いは見られなかった。ただ、ウインドレス鶏舎の農場は、開放鶏舎に比べ、有意に低かった。このことから、鶏舎の飼育環境をコントロールし易いウインドレス鶏舎にすることが、カンピロバクター非保菌鶏を生産

する一助であると思われた。

冷凍処理を通じた鶏肉中カンピロバクターの低減効果については、凍結処理の効果を定量的な検査により再検証する必要があると考えた。

4 で保持した場合の生菌数は 48 時間後まで変化が無かったが、 -20 および -80 で保管した場合では $1/100$ に減少した。このことから、凍結による生菌の減少効果があることは判明したが、カンピロバクターが 0cfu とはならない。ヒトのカンピロバクター感染菌量は 10^2cfu 以下であることから、鶏肉の生食は避けるべきであろう。

市販食肉の汚染調査結果として、牛スライス肉(20 検体)および豚スライス肉(22 検体)からはカンピロバクターが分離されなかった。2002 年に実施したカンピロバクター汚染調査においても、市販牛ひき肉(50 検体)および豚ひき肉(50 検体)からカンピロバクターは検出されていない。牛肉や豚肉(内臓肉を除く)は我が国の食肉由来の食中毒であるカンピロバクターのリスク要因としての役割は低いと思われる。カンピロバクターは鶏皮がついている 42% (11/26 検体)の鶏モモ肉および 40% (12/30 検体)の鶏ムネ肉から、また 6% (2/31 検体)の鶏ササミから分離された。鶏肉はカンピロバクター汚染があると同時に、販売されている部位ごとにカンピロバクターの汚染率が異なり、モモ肉、ムネ肉はササミよりも高率に汚染されていることが判明した。

3. 流通段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

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ことも視野に入れる必要があり、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)が望ましいと考えられる。

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。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

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

1. 農場におけるカンピロバクターの制御に関する研究～農場内伝播に関する研究～

東北地方の養鶏農場で飼養されるブロイラー鶏からは高率にカンピロバクターが分離された。迅速検出法として、イムノクロマト法は遺伝子検出法とほぼ同等の成績を示し、農場出荷時や食鳥処理場搬入時における現場での汚染識別に有用と目された。農場間、あるいは親鶏ロット別の鶏舎汚染率調査から、本研究で対象とした鶏群のカンピロバクター汚染が垂直伝播に因る可能性は低いと考えられた。遺伝子型別法を通じて、農場内蔓延様式が農場毎に異なることが明らかとなったが、作業員の動線に沿った伝播が蔓延の一因として推察された。

～農場内侵入要因の探索と持続汚染に係る細菌学的研究～

九州地方の養鶏農場の協力を得て、農場内環境におけるカンピロバクター汚染状況を調査した。結果として環境検体の多くは陰性を示し、当該農場では安定的な汚染経路が成立していないことが想定された。また、カンピロバクター保菌を顕すブロイラー鶏の日齢を追跡した結果、31日齢より認められる事象を確認した。持続汚染が想定される2農場を対象として、一定の時間軸をとって、分離株の遺伝子型別を行い、農場の持続汚染が必ずしも同一株の常在化によるものではないことを明らかにした。

2. 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

カンピロバクター保菌鶏が食鳥処理場で処理されると、非保菌鶏のと体を汚染するとともに施設を汚染し、その汚染が次に処理すると体を汚染してい

ることが遺伝子学的に実証された。鶏肉汚染低減策としては、従ってカンピロバクター非保菌鶏を食鳥処理場にて先行搬入・処理するという、区分処理が望ましいと考えられる。

カンピロバクターの汚染の無い鶏肉を生産するためには、生産農場でカンピロバクター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。農場でカンピロバクターを保有しない鶏を生産することは難しいと思われるが、その一助として鶏舎の形態はウインドレスのほうが有効であると思われた。

市販牛肉および豚肉からカンピロバクターは検出されないものの、鶏肉はカンピロバクターに高度に汚染していることから、鶏肉はカンピロバクター食中毒の汚染源として大きな役割を担っていることが示唆された。また、鶏モモ肉や鶏ムネ肉は鶏ササミよりも高率にカンピロバクターに汚染していることが確認された。

汚染鶏肉に対する凍結処理は、カンピロバクターの生菌数を有効に低減できることが再検証され、本菌による食中毒のリスク低減に役立つ可能性が示唆された。

3. 流通段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

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法により検証し、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示したが、冷凍初期段階 (2日冷凍) では統計学的に有意差を認めず。より長時間の冷凍処理が生存性・培養性の両面より微生物危害を考慮した上では求められよう。また、冷凍初期過程で認められた冷凍抵抗性の菌株間差異は、処理の長期化により低減を示し、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も、

一定時間以上の冷凍処理が有効と目された。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

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

該当なし

G. 研究発表

1. 書籍

- 1) Pascoe B, Lappin-Scott H, Sheppard SK, Asakura H. (2014) A chapter of “Does Biofilm formation aid colonization and infection in *Campylobacter*?” in a book of “*Campylobacter* Ecology and Evolution”. Caister Academic Press. In press.

2. 論文

- 1) Asakura H, Hashii N, Uema M, Kawasaki N, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yamamoto S. (2013) *Campylobacter jejuni pdxA* affects flagellum-mediated motility to alter host colonization. PLoS ONE. 8(8):e70418.
- 2) 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.
- 3) Asakura H, Masuda K, Yamamoto S, Igimi S. (2014) Molecular approach for tracing the

dissemination routes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in bovine offal at slaughter. BioMed Res Int. 2014: e39139.

H. 知的財産権取得状況

該当なし