

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

## 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

研究協力者 藤田雅弘 遠藤健太郎 水谷昌代 渡 昭博 松田錦弥 小畑 敏

群馬県食肉衛生検査所

古茂田恵美子 重村泰毅

東京家政大学

鈴木智之

滋賀県衛生科学センター

石岡大成 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

*C. jejuni* は42%(11/26検体)の市販鶏モモ肉および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。牛スライス肉(20検体)および豚スライス肉(22検体)からは分離されなかった。鶏肉はカンピロバクター食中毒の感染源となりうるということが再確認された。カンピロバクター汚染のない食鳥と体を生産することを目的として、カンピロバクター保菌鶏群および非保菌鶏群の飼育状況のアンケート調査ならびに食鳥処理場の搬入時の盲腸内容および体の拭き取り検査を実施した。カンピロバクター保菌鶏が食鳥処理場で処理されると、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鶏と体を汚染していることが分離株のPCR-RFLP 遺伝子型によって判明した。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日々の処理の最初に処理し、次に汚染鶏群を処理すること、いわゆる区分処理をすることで非保菌鶏群のと体へのカンピロバクター汚染は防止できることが確認された。欧米で行われている凍結処理について凍結温度による菌数の変化をみたところ、-20 および-80 で凍結処理することにより、菌数が1/100に減少した。このことから、汚染鶏肉を凍結処理することは、危害の軽減効果があるものと考えられた。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をウインドレスにすることが効果的であると思われる。

### A. 研究目的

2012年、我が国の食中毒発生件数は1,100件、食中毒患者数は26,699人である。そのうちウイルス由来は432件(39.3%)、18,637人(70.0%)、細菌

由来は419件(38.1%)、5,964人(22.3%)である。

主な病因物質別にみた細菌・ウイルス性食中毒事件数、患者数ともに第1位はノロウイルス(416件、17,632人)、第2位はカンピロバクター(266件、

1,834人)であり、ノロウイルス及びカンピロバクターによる食中毒は公衆衛生上重要である。カンピロバクターのうち、*C. jejuni/coli*は牛、鶏、豚などの家畜、不衛生に取り扱われた動物性食品から分離することができる。特に鶏肉や汚染された食品の喫食、牛肝臓の生食は人のカンピロバクター感染症の主な原因となっている。牛の肝臓の生食は食品衛生上きわめて危険であることから、平成24年6月に食用禁止となっている。

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<sup>1,2)</sup>、*C. jejuni*は冷蔵庫内でも長期間生存すること<sup>3)</sup>、比較的少量の菌量の摂取でも食中毒を発症すること<sup>4)</sup>、そして食中毒のみならず、食中毒症状の回復後に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<sup>5)</sup>等から食品衛生上のみならず医学的にも注視されている。

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必要である。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<sup>6,7)</sup>。

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<sup>8)</sup>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。

平成24年度の調査ではカンピロバクター汚染農場と非汚染農場が存在すること、非汚染農場

から搬入された鶏のみを食鳥処理を行うと、製造されたと体からカンピロバクターは分離されることが判明した。今年、カンピロバクター保菌農場、非保菌農場へのアンケート調査を行い、どのような飼育要因がカンピロバクター汚染の有無に影響しているかを解明するとともに、食鳥処理場内へ搬入された鶏の盲腸便とと体のふき取り調査および分離カンピロバクターの遺伝子型別を行い、汚染源の特定を試みた。また、冷凍処理によるカンピロバクターの減少効果ならびに首都圏で流通している鶏のカンピロバクター汚染率等について調査を実施した。

## 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) 農場のアンケート調査

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(別添1)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 ブイオン(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(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(ピオメリュー)により同定した. また, klena らの方法<sup>9)</sup>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(25cm<sup>2</sup> × 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 ブイオ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(図 1-2). 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<sup>9)</sup>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<sup>10)</sup>を用いて *flagellin A* 遺伝子を増幅後, Nachamkin らの方法<sup>11)</sup>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  $8.0 \times 10^7$  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,  $42 \pm 1$  ℃,  $25 \pm 1$  時間, 微好気条件下(80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>)で増菌培養後, Butzler agar および mCCDA に塗抹し,  $42 \pm 1$  ℃,  $48 \pm 2$  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<sup>12)</sup>が報告した PCR 法を用いて菌種の同定を行った.

#### 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) 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： $P = 0.03$ ) (表 1-1)。

#### 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(図 1-3, 図 1-4)。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。

搬入口ットごとの盲腸便およびと体拭き取り液からのカンピロバクター検出状況および分離株のPCR-RFLP型を表 1-2 に示す。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減少効果

鶏肉1gあたり $8.0 \times 10^7$ cfu/mlの試験菌液を1ml接種し、10倍量のPrestonブイオンを加え(初期菌量は $4.0 \times 10^6$ cfu/ml)、4、-20、-80で静置した後、経時的に生菌数を測定した結果を図 2-1 に示す。鶏肉を4で保持した場合、2時間後は $2.6 \times 10^6$ cfu/ml、24時間後は $2.8 \times 10^6$ cfu/ml、48時間後は $7.4 \times 10^6$ cfu/mlであり、48時間後では若干であるが増加していた。鶏肉を-20で保持した場合、2時間後は $1.9 \times 10^6$ cfu/ml、24時間後は $3.3 \times 10^4$ cfu/ml、48時間後は $9.3 \times 10^4$ cfu/ml、鶏肉を-80で保持した場合、2時間後は $3.2 \times 10^5$ cfu/ml、24時間後は $4.5 \times 10^4$ cfu/ml、48時間後は $9.0 \times 10^4$ cfu/mlであった。-20および-80で保管した場合、カンピロバクターの菌数は1/100に減少した。

#### 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。牛スライス肉、豚スライス肉からカンピロバクターは分離できなかった。

#### D. 考察

##### 1. A食鳥処理場でのカンピロバクター汚染調査

カンピロバクター非保菌鶏群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内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かった。よって、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汚染していることが確認された。

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。

## 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。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  $10^2$ cfu 以下<sup>8)</sup>であることから、鶏肉の生食は避けるべきであると思われた。

## 3. 市販牛・豚・鶏ひき肉のカンピロバクター汚染調査

今回、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<sup>13)</sup>。牛肉や豚肉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た。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ともに、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。

鶏肉から分離されるカンピロバクターは *C. jejuni* のみであり、鶏肉は *C. jejuni* 食中毒の感染源となりうることが再確認された。

## E. 結論

市販牛肉および豚肉では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、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。

カンピロバクター保菌鶏が食鳥処理場で処理されると、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証明された。鶏肉へのカンピロバクター汚染を無くするためには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、非保菌鶏群のと体へのカンピロバクター汚染は防止できることが確認された。

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。

汚染された鶏肉は、凍結処理を行うことで、カンピロバクターの生菌数の1/100の減少が期待できることから、凍結処理はカンピロバクター食中毒のリスク低減に役立つ可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表等

なし

### 2. 学会等発表

遠藤健太郎, 水谷昌代, 杉田裕子, 藤田雅弘, 渡 昭博, 松田錦弥, 小畑 敏, 森田幸雄. 「食鳥処理場でのカンピロバクター汚染の実態」日本獣医公衆衛生学会(関東・東京地区), 群馬

県北群馬郡伊香保町(ホテル木暮)平成 24 年 9 月 8 日(別添 2) 学術奨励賞受賞(別添 3)

水谷昌代, 遠藤健太郎, 杉田裕子, 町田千晶, 高山真津香, 藤田雅弘, 松田錦弥, 小畑 敏. 「カンピロバクター汚染に凍結処理は有効か」日本獣医公衆衛生学会(関東・東京地区), 群馬県北群馬郡伊香保町(ホテル木暮)平成 24 年 9 月 8 日(別添 4) 地区学会長賞受賞(別添 5)

## 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

## 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・ジェジュニノ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](http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyo2-campylobacter_k_n.pdf)
- 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) Wassenaar TM, Newell DG: Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl Environ Microbiol 2000;60:1-9.
- 11) Nachamkin I, Bahachick K, Patton CM : Flagelin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis . J. Clin . Microbiol. 1993;31:1531-1536.
- 12) 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.
- 13) 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.

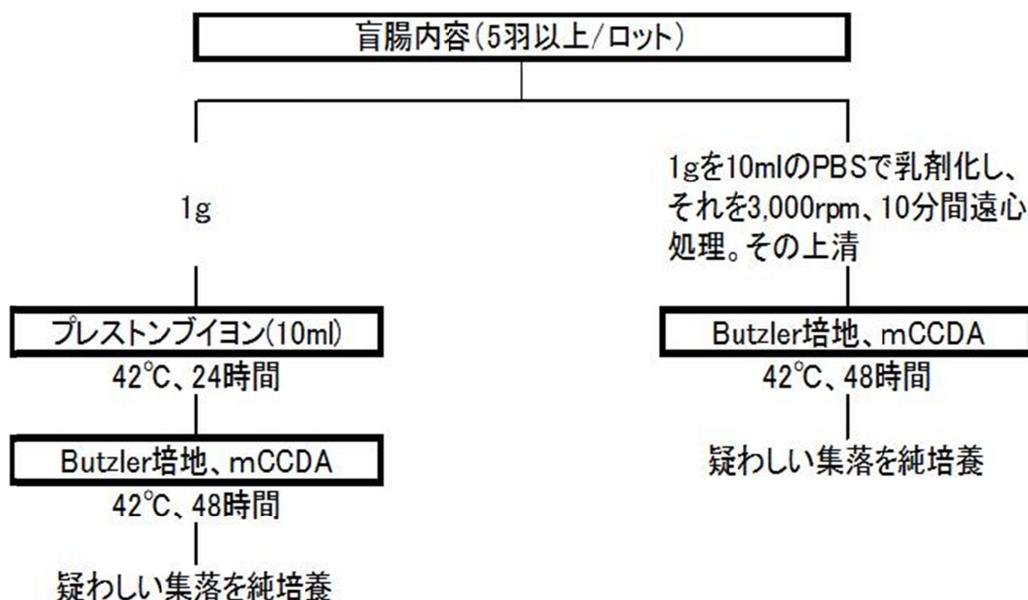


図1-1 搬入鶏におけるカンピロバクター保菌調査に用いた分離方法

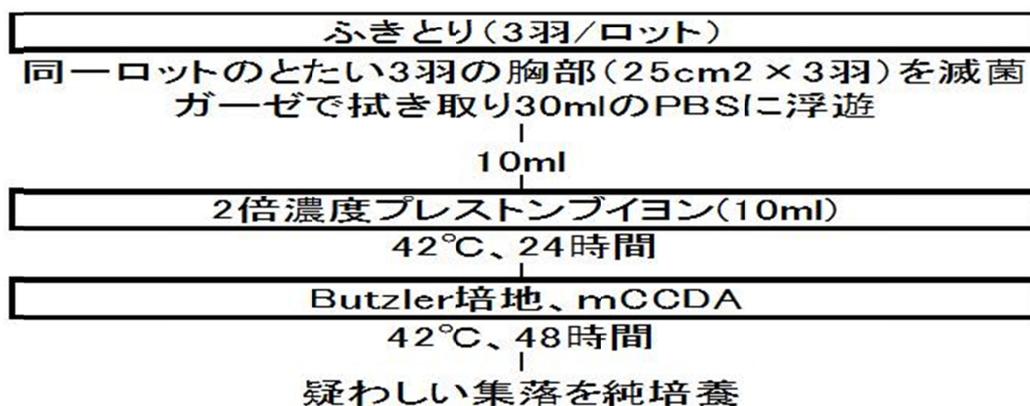
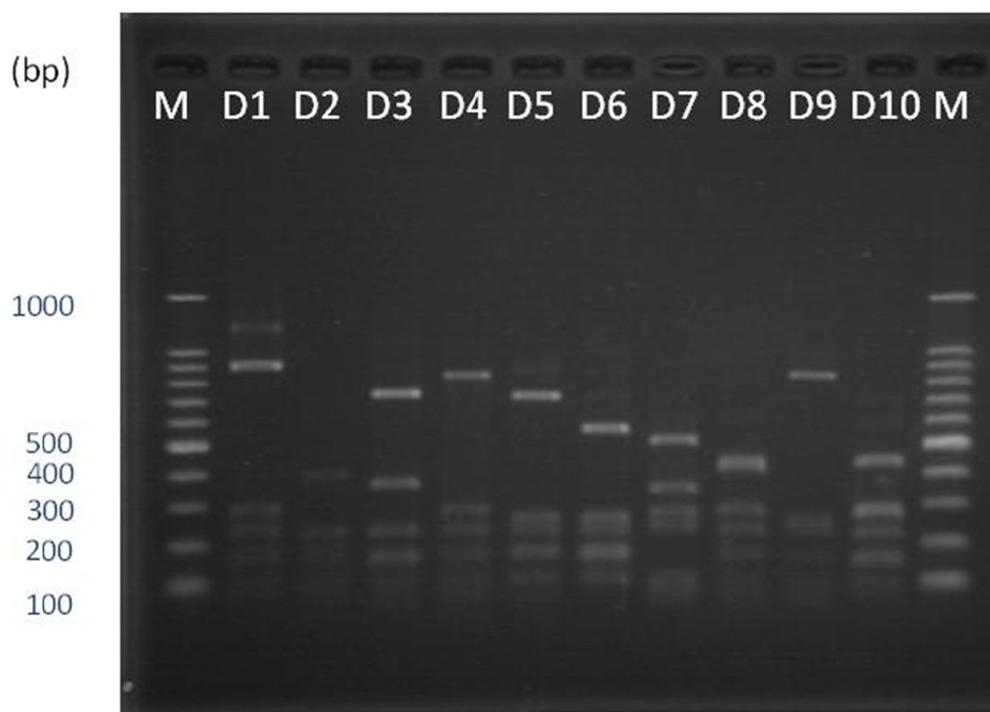
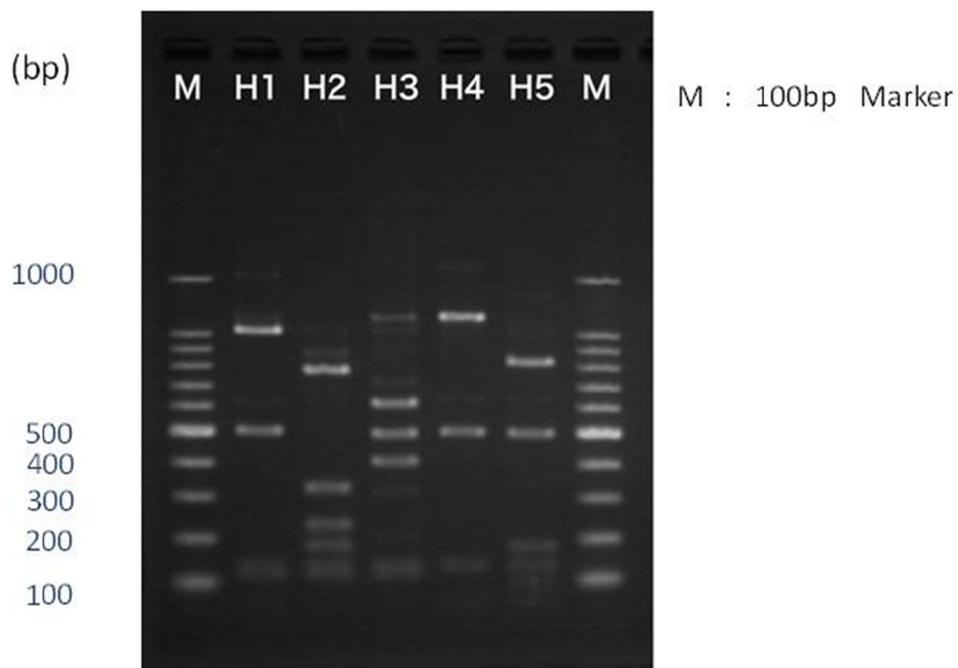


図1-2 と体のカンピロバクター拭き取り検査に用いた分離方法



M : 100bp Marker

図1-3 制限酵素*Dde* を用いたPCR-RFLP型



M : 100bp Marker

図1-4 制限酵素*Hinf* を用いたPCR-RFLP型

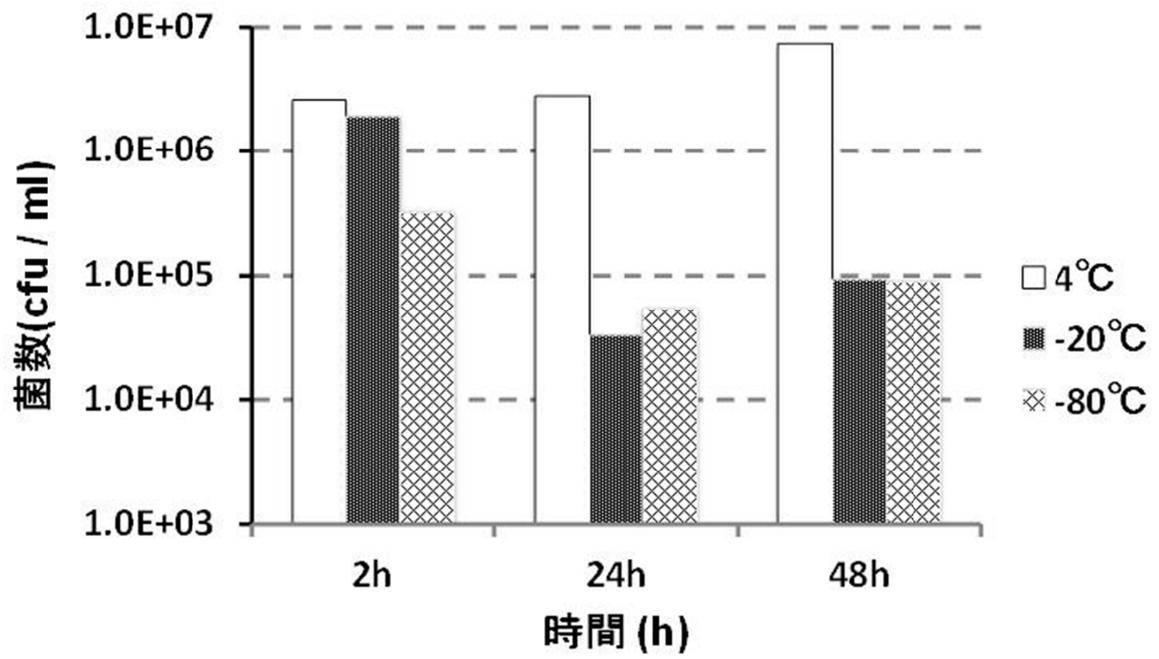


図2-1 冷蔵・凍結処理による菌数の変化

表1-1 カンピロバクター保菌農場・非保菌農場の飼育鶏舎の形態

鶏舎の形態	カンピロバクター		計
	保菌農場	非保菌農場	
開放	6	2	8
ウインドレス	1	6	7
計	7	8	15

表1-2 搬入ロットごとの盲腸便およびと体ふき取り液からのカンピロバクターの検出状況および分離株のPCR-RFLP型

処理日	ロット名	盲腸便		と体拭き取り液	
		検出の有無	PCR-RFLP 遺伝子型	検出の有無	PCR-RFLP 遺伝子型
5月10日	NGT1	-		-	
	MGF	-		-	
	HJO1	+	LH	+	L
5月14日	TKS	-		-	
5月24日	OIB	-		-	
	IST	-		-	
	MGE	-		-	
5月31日	KNB1	+	O	+	O
	ISK	+	P	+	O,P
7月10日	AKG1	+	A	+	J
	HJO2	+	E,F	+	E,F
	TYC	-		+	A,E
7月17日	AKG2	+	G,A	+	A
	NGT2	-		+	G
	KGW	+	B,E,I	+	B,E
7月26日	HGW1	-		-	
	HGW2	+	C	+	C
	TKT1	+	I	+	I
10月16日	HJM1	+	M,R	+	M
	HJM2	+	N	+	B
	TKT2	+	I	+	IO
10月30日	HKD	-		-	
	NGO	-		-	
	KNB2	+	O	+	O

-:カンピロバクター非検出      +:カンピロバクター検出

## 別添 1

### 農場 アンケート調査 (質問内容)

鶏舎の名称 \_\_\_\_\_ 所在地 \_\_\_\_\_  
鳥の種類 \_\_\_\_\_ 導入雛の鶏舎名 \_\_\_\_\_  
飼育鶏舎の形態 \_\_\_\_\_

#### 1 農場での衛生対策について質問します。

(1) 農場のHACCP方式による管理をご存じですか。 ・導入している ・導入していない

(2) 最初にカンピロバクターに関することについてお伺いします。

カンピロバクターが食中毒の原因となることを知っていますか。

・知っている ・知らない

カンピロバクターによる鶏汚染防止に関心がありますか。

・ある ・ない

カンピロバクター汚染防止対策を何か行っていますか。

・行っている ・行っていない

行っている場合は差し支えなければ対策を記載ください。

[ \_\_\_\_\_ ]

(3) 続いてサルモネラに関することについてお伺いします。

サルモネラが食中毒の原因となることを知っていますか。

・知っている ・知らない

サルモネラによる鶏舎の汚染防止に関心がありますか。

・ある ・ない

鶏のサルモネラ汚染防止対策を何か行っていますか。

・行っている ・行っていない

行っている場合は差し支えなければ対策を記載ください。

[ \_\_\_\_\_ ]

#### 2 農場での洗浄消毒の実施について質問します。

(1) 鶏舎の洗浄・消毒を実施していますか。 ・している ・していない

(2) 以下の項目で実施するものに \_\_\_\_\_ をつけてください。

薬品での消毒 ・する ・しない

器具搬出 ・毎回行う ・しない

堆積物搬出 ・する ・しない

鶏舎周囲の羽毛・糞便・塵埃 ・除去する ・除去しない

鶏舎の破損 ・ある ・ない

器具の破損 ・ある ・ない

消毒を実施している場所

床 ・する ・しない

天井	・する	・しない
犬走り	・する	・しない
柱	・する	・しない
壁面	・する	・しない
カーテン	・する	・しない
棧(さん)	・する	・しない
サービスルーム	・する	・しない
ホッパー	・する	・しない
給餌器ライン	・する	・しない
飼料タンク	・する	・しない
マイクロミスト室	・する	・しない
鶏舎側溝	・する	・しない
器具器材	・する	・しない
給水器	・する	・しない
乾燥	・実施する	・実施しない
石灰消毒	・実施する	・実施しない

(3)一般的な事項についてお伺いします。

異常鶏の排除をしていますか。

- ア 異常鶏の淘汰                    ・している                    ・していない  
 イ 死亡鶏の排除                    ・している                    ・していない

ワクチン・薬剤等を使用していますか。

- ア ワクチン投与のプログラムの有無                    ・有                    ・無  
 イ 抗生物質投与プログラムの有無                    ・有                    ・無  
 ウ その他薬剤使用                    ・有                    ・無

飼養の環境についてお伺いします。

ア 飼育密度に注意を払っていますか。

- ・定期的にチェックしている    ・チェックしていない

イ 室温管理をしていますか。

- ・定期的にチェックしている    ・チェックしていない

ウ 換気を行っていますか。

- ・定期的にチェックしている    ・チェックしていない

飼料の搬入・保管の状況についてお伺いします。

ア 飼料会社からのサルモネラ衛生証明をもらっていますか。    ・いる    ・いない

イ 飼料保管庫を定期的に清掃していますか。                    ・している    ・していない

ウ 飼料保管庫の防湿対策をしていますか。                    ・している    ・していない

エ 保管場所で定期的にネズミを駆除していますか。            ・している    ・していない

給与する飲水についてお伺いします。



## 別添 2

### 食鳥処理場内でのカンピロバクター汚染の実態

遠藤健太郎<sup>1)</sup>、水谷昌代<sup>1)</sup>、杉田裕子<sup>1)</sup>、藤田雅弘<sup>1)</sup>  
渡 昭博<sup>1)</sup>、松田錦弥<sup>1)</sup>、小畑 敏<sup>1)</sup>、森田幸雄<sup>2)</sup>

1) 群馬県食肉衛検、2) 東京家政大学

#### はじめに

カンピロバクター食中毒の対策として示された、「食鳥処理場における非汚染鶏群および汚染鶏群の区分処理を行う方法(食品安全委員会の食品健康影響評価研究)」では、食鳥処理場での区分処理が重要であるとしている。区分処理を指導する上で、処理鶏群の *Campylobacter* 保菌状況とその処理されたときの汚染状況に関する報告は数少ない。今回、食鳥処理場において処理鶏群の保菌状況およびとたいの *Campylobacter* 汚染実態を調査した。

#### 材料および方法

調査対象は、2012年5月から10月の間に食鳥処理場Aに搬入された26ロットについて、盲腸便130検体(5羽/ロット)、とたいの拭き取り液78検体(9羽/ロット)とした。盲腸便1gを10倍量のPBSで乳剤化後、3,000rpmにて10分間遠心し、上清をButzler agerおよびmCCDAに塗抹培養した(42、48hr、微好気)。とたいの拭き取りは、「食鳥処理場におけるHACCP方式による衛生管理指針」に従った。得られた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(ピオメリュー)により同定した。また、klenaらの方法に従い、multiplex-PCR法により菌種を同定した。さらに、flagellin A geneのPCR-RFLP法によりgenotypingを実施した。Nachamkinらの方法に準拠し、*Dde* I(Roch)および*Hinf* I(Roch)で切断し、切断パターンを観察した。

#### 結果

調査した鶏群の盲腸便14ロット68検体から*Campylobacter*が検出され、拭き取り液からは16ロット34検体から検出された。*C. jejuni*は盲腸便で44検体、拭き取り液で31検体から検出された。*Dde* および*Hinf*の2種類の制限酵素を用いたPCR-RFLP法の結果から、盲腸便由来株は11種類の切断パターンに、拭き取り液由来株は10種類の切断パターンに類別された。保菌鶏群の拭き取り液から分離された株は、同一ロットの盲腸便由来株と同一の切断パターンであった。また、盲腸便から*Campylobacter*が検出されない非保菌鶏群(清浄ロット)の拭き取り液から*C. jejuni*が検出されたケースが2日間あったが、直前に処理された保菌ロットの盲腸便由来株と同一の切断パターンを示す株が検出された。更に、清浄ロットのみを処理した場合、拭き取り液から*Campylobacter*は検出されなかった。

#### 考察

今回の結果から、PCR-RFLP法は、食鳥処理場内での*Campylobacter*の疫学解析と多様性を評価する上で有用であると考えられた。また、PCR-RFLPの結果から食鳥処理場内での交差汚染が示され、非保菌鶏群のとたいが、保菌鶏群の*Campylobacter*に汚染されることから、区分処理による汚染防止が必要であると考えられた。

# 学術奨励賞

食鳥処理場内でのカンピロバクター汚染の実態

群馬県食肉衛生検査所

遠藤健太郎様 水谷昌代様  
杉田裕子様 藤田雅弘様  
渡 昭博様 松田錦弥様  
小畑 敏様 森田幸雄様

あなたは平成二十五年度日本獣医  
公衆衛生学会(関東・東京)において  
優秀な研究成果を発表され  
貴重な実績を残されましたよって  
ここに功績を讃えこれを賞します

平成二十五年九月八日

獣医学術関東・東京合同地区学会

会長 木村芳之



## 別添 4

### カンピロバクター汚染対策に凍結処理は有効か

水谷昌代、遠藤健太郎、杉田裕子、町田千晶、高山  
真津香、藤田雅弘、松田錦弥、小畑 敏

群馬県食肉衛検

#### ．はじめに

カンピロバクターに汚染された鶏肉により、調理器具や非加熱食品への交差汚染が起ることの指摘がある。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。

今回、Etidium Monoazaide (EMA) 処理により、生菌のみを SYBR Green 法によるリアルタイム PCR (qPCR) で検出する方法 (EMA-qPCR) を検討した。

#### ．材料および方法

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  $8.0 \times 10^7$  CFU/ml の試験菌液を 1ml 接種し、10 倍量の Preston プイオンを加え、4、-20、-80 で静置した後、経時的に生菌数を測定した。同量のサンプルを遠心濃縮し、EMA-qPCR を実施した。Viable Bacteria Selection Kit for PCR (TaKaRa) を用いて EMA 処理を行った。振り出し液からの DNA の抽出には QIA DNA mini Kit (QIAGEN) を用いた。qPCR は Wilson らの *gyrA* を検出するプライマーを使用し、増幅条件は Fukushima らの方法に従った。さらに、市販冷凍鶏肉 33 検体および市販冷蔵鶏肉 21 検体の振り出し液についても EMA-qPCR を行った。

#### ．成績

試験菌液の生菌数と EMA-qPCR の Ct 値に高い相関が見られ、検出限界は  $10^3$  CFU/ml であった。加熱死菌液では、EMA-qPCR による増幅信号は得られず、死菌の DNA が完全に排除されたことがわかった。鶏肉を 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 で保管した場合には 1/100 に減少した。EMA 処理の有無による Ct 値に違いはみられなかった。市販鶏肉については、冷凍肉 33 検体中 6 検体、冷蔵肉 21 検体中 2 検体から EMA-qPCR による増幅信号が得られた。

#### ．考察

試験菌を接種した鶏肉を凍結処理することにより、平板培養で得られた生菌数が減少したが、凍結処理による Ct 値に違いが見られなかったことから、VBNC 状態の菌が増加することが示唆された。凍結による生菌の減少効果は、二次汚染のリスク低減に一定の効果が期待できるが、ヒトの感染菌量が  $10^3$  であることから、鶏肉の生食は避けるべきである。

# 賞状

地区学会長賞

カンビロバクター汚染対策に凍結処理は有効か  
群馬県食肉衛生検査所

水谷昌代様 遠藤健太郎様  
杉田裕子様 町田千晶様  
高山真津香様 藤田雅弘様  
松田錦弥様 小畑敏様

平成二十五年度日本獣医公衆衛生学会(関東・東京)において  
発表された右の研究業績は極めて  
優秀なものと認めその功績を  
讃えこれを賞します

平成二十五年九月八日

日本獣医公衆衛生学会

関東東京合同地区学会長 山本茂貴

