

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

流通段階におけるカンピロバクター制御に関する研究

～冷凍処理過程における鶏肉中カンピロバクターの生存挙動に関する研究～

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	榊田 和彌	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	倉園 久生	帯広畜産大学	畜産学部
	川本 恵子	帯広畜産大学	動物・食品衛生研究センター

研究要旨：カンピロバクター・ジェジュニ（以下、*C. jejuni*）による食中毒は、当該菌に汚染した鶏肉に起因する割合が高い。鶏肉における高頻度の汚染実態を鑑み、その低減対策として、アイスランド・デンマーク・ニュージーランドの3カ国では既に流通前の冷凍処理が適用されている。昨年度は、国内流通鶏挽肉を用いた添加回収試験により、1週間の冷凍により概ね $10^1 \sim 10^2$ オーダーの菌数低減が図られることを培養法により実証した。本年度は、本菌の生存性が培養法と必ずしも一致しないという本菌の特性を鑑み、エチジウムモノアザイド（EMA）を用いたリアルタイムPCR法（EMA-PCR法）により、食品中での生存性評価を実施すると共に、菌株間での冷凍抵抗性に関する検討を行った。冷凍処理に伴う、鶏挽肉中生存菌数の挙動を培養法とEMA-PCR法で同時に検証したところ、冷凍初期（冷凍2日目）では、EMA-PCR法の成績が40%前後の生存を示したのに対し、培養法では30%程度の生存性を示すにとどまった。以降の冷凍時間では、両手法の成績間に明確な差異は認められなかったことから、冷凍処理を行うにあたっては、少なくとも2日以上の間隔設定が有効と考えられた。また、鶏肉に20菌株を添加し、2日・7日間の冷凍処理を行ったところ、冷凍2日間では生存性に菌株間で高い有意差を認めた。7日間の冷凍処理後の菌数の菌株間有意差は顕著に低減を示した。以上の結果より、冷凍処理時間の設定にあたっては、菌株間の冷凍抵抗性や生存性挙動を考慮する必要性が提唱された。

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る。本属菌の中で、*C. jejuni* と *C. coli* は 1982

年に食中毒細菌に指定され、ヒトの下痢症と高い関連性を示すことが近年の疫学研究の進展に伴い明らかになってきている。

わが国におけるカンピロバクター食中毒発生は、

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、滅菌ストマツカー袋に分取した。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、 $-20^{\circ}\text{C}$  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 1X(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 プ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、倫理面の問題はない。

### 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と、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

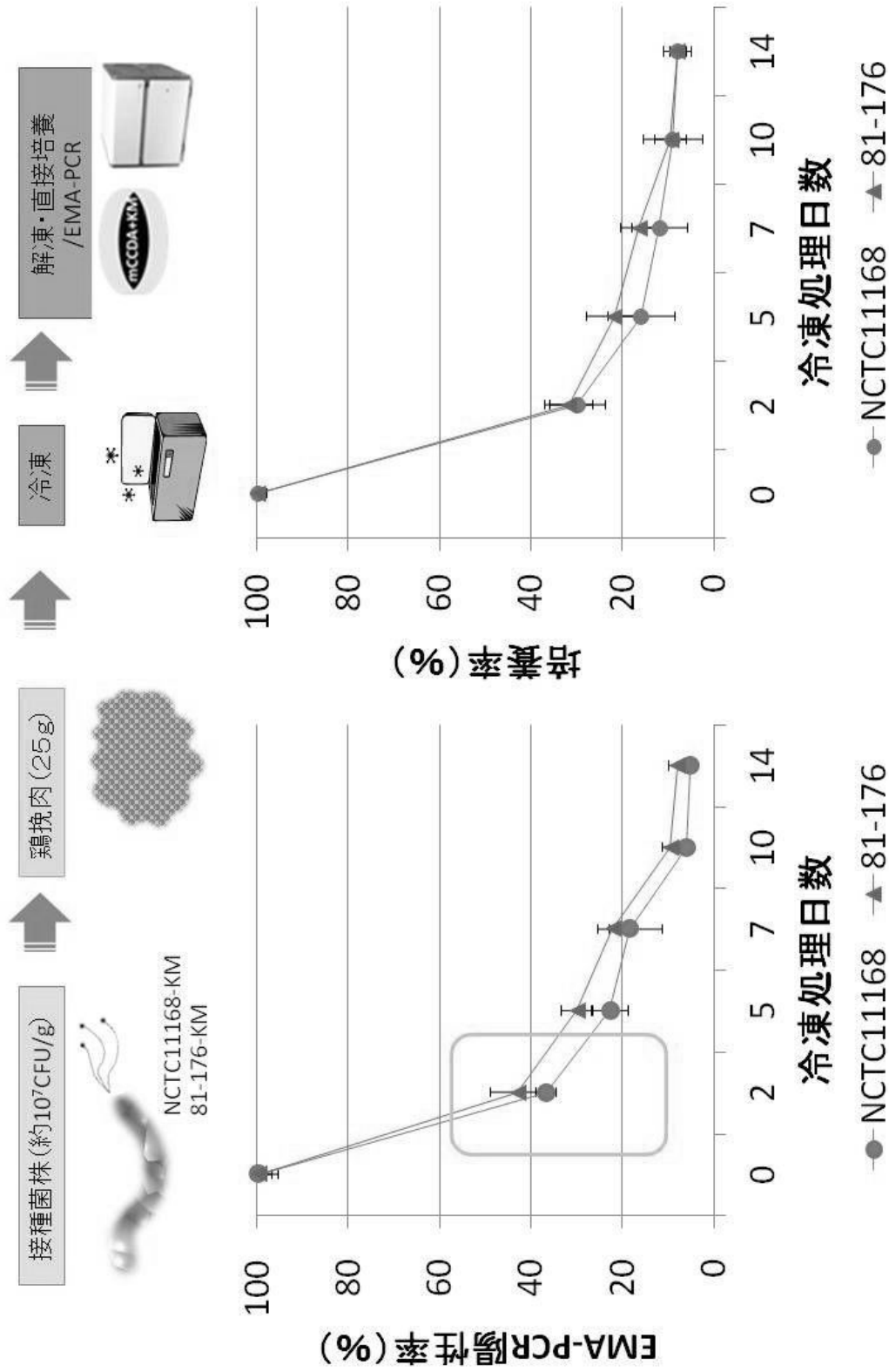
##### 2. 実用新案登録

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

