

201426009A

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

平成26年度 総括・分担研究報告書

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

平成27（2015）年3月

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

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- 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
朝倉 宏

----- 3

II. 分担ならびに委託研究報告

1. 農場段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

カンピロバクターの汚染伝播様式と汚染源推定に関する研究

朝倉 宏、山本 茂貴 他

----- 19

ブロイラー鶏におけるカンピロバクターの持続汚染に関する研究

中馬 猛久 他

----- 31

2. 食鳥処理段階におけるカンピロバクター制御に関する研究

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

森田 幸雄 他

----- 39

3. 流通段階におけるカンピロバクター制御に関する研究

国産・輸入鶏肉におけるカンピロバクター汚染実態に関する研究

朝倉 宏 他

----- 51

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

牛内臓肉の衛生管理に関する研究

山本 茂貴 他

----- 57

牛内臓肉の洗浄および加熱処理に関する研究

朝倉 宏、山本 茂貴 他

----- 61

5. と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

山本 茂貴 他

----- 67

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 79

平成 26 年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者

山本 茂貴 東海大学
森田 幸雄 東京家政大学
中馬 猛久 鹿児島大学

研究協力者

安藤 匡子 鹿児島大学
五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所
石岡 大成 国立感染症研究所
小野 聡美 宮城県食肉衛生検査所
小倉 洋裕 群馬県食肉衛生検査所
梶川 典子 神奈川県食肉衛生検査所
川久 通隆 兵庫県食肉衛生検査センター
川原 俊介 MP アグロ株式会社
川本 恵子 帯広畜産大学
木村 博一 国立感染症研究所
楠 哲也 神奈川県食肉衛生検査所
倉園 久生 帯広畜産大学
古茂田 恵美子 東京家政大学
後藤 重幸 群馬県食肉衛生検査所
小林 清美 宇都宮市食肉衛生検査所
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
坂野 智恵子 群馬県食肉衛生検査所
重村 泰毅 東京家政大学
品川 邦汎 岩手大学
杉本 治義 群馬県食肉衛生検査所
鈴木 智之 滋賀県衛生科学センター
橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所
茶園 明 NPO 法人 日本食品安全検証機構
橋本 勝弘 埼玉県食肉衛生検査センター
橋本 夏美 さいたま市食肉衛生検査所
畑野 克巳 千葉県東総食肉衛生検査所
渡辺 友子 宮崎都濃食肉衛生検査所
山本 隆宏 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
宮手 浩	神奈川県食肉衛生検査所
宮良 当一郎	沖縄県中央食肉衛生検査所
谷 泉乃	鳥取県食肉衛生検査所
横溝 力男	横浜市食肉衛生検査所
横山 智子	北海道早来食肉衛生検査所
山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所
渡辺 邦雄	共立製薬(株)
渡辺 茂樹	千葉県東総食肉衛生検査所

(敬称略、五十音順)

I. 総括研究報告

平成26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：本研究では、(1) 食鳥肉のカンピロバクター等の制御、(2) 牛内蔵肉の衛生管理、(3) と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化の3項目に係る微生物リスク管理に関わる基礎・応用知見の集積を通じ、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。平成26年度は各分担項目の充実をはかるための諸検討を行い、以下の知見を得た。

食鳥肉のカンピロバクター等の制御に関する項目として、農場段階では、東北・九州地方の農場の協力を得て、調査を行った。東北地方の2農場を対象に、経時的汚染動態に関する検討を行い、特定の鶏舎が汚染源（増幅源）として出荷時における広範な農場内汚染を伝播したと推察される知見を得た。九州地方の農場では、持続汚染を顕すことが明らかな農場を対象として、一定期間毎に分離調査と分離株の遺伝子型別を行うことで、持続汚染を顕す農場においても、特有の遺伝子型株が持続的に農場に定着している訳ではないことが明らかになった。食鳥処理段階に関する事項として、①処理場搬入鶏群の糞便中カンピロバクター菌数を測定したところ、A農場では搬入14日前・7日前・当日でそれぞれ 3.7×10^7 CFU/g、 2.4×10^6 CFU/g、 4.2×10^7 CFU/g、B農場では搬入14日前・7日前・当日でそれぞれ 2.2×10^5 CFU/g、 1.7×10^5 CFU/g、 1.9×10^5 CFU/gであり、顕著な差異は認められなかった。②同一糞便検体を用いて、迅速簡便キットの有効性を評価し、一定数以上の汚染を示す検体であれば、有効性は担保されるとの結論を得た。③エアーチラー設置処理場での聞き取り調査を行い、塩素滴下チラー水による処理後に冷却されたエアーチラー室内で30分間保持するという稼働状況を把握した。流通段階では、国産冷蔵鶏肉と輸入冷凍鶏肉におけるカンピロバクター検出率の比較を行い、これまでの知見の通り、国産冷蔵鶏肉の方が有意に高い検出率を示す状況を把握した。また、国産流通鶏肉の汚染率を部位別に比較した昨年度のデータとは異なる成績として、ささみ肉で最も高い検出率を認めた。また、カンピロバクター検出の有無と一般細菌数や腸内細菌科菌群数等の指標菌数は統計学的関連性を示さない状況を把握した。

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、各食肉センター内の内臓処理施設で処理される牛白物（第二胃、第三胃、小腸、大腸）を対象に、漿膜面と粘膜面での汚染指標菌数の比較を行った。漿膜面の菌数が粘膜面より高い施設も存在していたが、衛生状況の良好な施設（全体での生菌数が概ね 10^2 – 10^3 CFU/g）では、粘膜面でより高い菌数（約1対数個/g）を認めたことから、漿膜面の汚染菌数が高い施設では、処理中の交差汚染が想定され、今後処理方法を改善すべきと考えられた。衛生状況の良い施設では、(1) 一頭毎に処理台を洗浄する、(2) 洗浄水を適切な頻度で交換する、(3) 大腸を切開する際、腸内容物の汚染を漿膜面に拡大しない、(4) 腸管の洗浄間に氷冷却を行う等のポイントが挙げられたが、それぞれの施設の構造・設備を変更しなければ達成できないものもあることから、共通のマニュアル化は現時点では困難と考えられた。

と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する検討としては、前年度までに取りまとめた、今後診断基準の改正が望ましいと考えられる疾病のうち、敗血症を例に挙げ、食肉衛生に関わる12自治体の職員を対象に議論する場を設定した。現行マニュアルをもとに、項目別に追加・削除・修正すべき要点を議論し、マニュアル案を作成した。

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 農学部)

研究協力者

安藤 匡子	鹿児島大学
五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所
石岡 大成	国立感染症研究所
岡野 純	宮城県食肉衛生検査所
小倉 洋裕	群馬県食肉衛生検査所
木村 博一	国立感染症研究所
後藤 重幸	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
坂野 智恵子	群馬県食肉衛生検査所
重村 泰毅	東京家政大学
品川 邦汎	岩手大学
杉本 治義	群馬県食肉衛生検査所
鈴木 智之	滋賀県衛生科学センター
橘 理人	国立医薬品食品衛生研究所
茶園 明	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
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
渡辺 邦雄	共立製菓(株)
横山 智子	北海道早来食肉衛生検査所
山本 詩織	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。これ迄のカンピロバクター制御に関する研究は、主として食鳥処理場での対策に焦点を当てて行われてきた。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、主たる汚染源が何処にあるのか、そしてどのような流れで農場全般の汚染を顕すのかについて、細菌学および遺伝学的手法を用いて検討する。(2) 食鳥処理場での衛生対策：食品安全委員会の食品健康影響評価研究で指摘された、処理順を考慮した上での交差汚染制御に関する手法の有効性をより明確にするため、汚染・非汚染鶏の識別にあたって対応可能な迅速簡便法について検討する。併せて、高濃度および低濃度汚染を示す農場由来検体における汚染菌数を把握する。(3) 流通段階：冷凍処理の有効性が実態として顕れていることを確認するため、輸入冷凍鶏肉と国産冷蔵鶏肉におけるカンピロバクターの汚染実態を比較・検証する。併せて、昨年度からの継続項目として、市販鶏肉における汚染実態を部位別に検討する。

2. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

牛内臓肉の衛生管理に係るこれまでの知見として、白物（胃及び腸）に関する研究は殆ど行われておらず、望ましい処理法の在り方に関する議論と実態把握を行う必要性が考えられた。本研究では、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して、特に漿膜面と粘膜面の指標菌数の比較を行うこととする。

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。本項目では、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た上で、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、アンケート調査を行い、その中で今後議論すべき疾病として挙げられた「敗血症」を対象に、同疾病の診断手法に関する議論とマニュアル案の作成について、食肉衛生分野の12自治体職員の協力を得て議論の上、検討する。

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26年9月-10月の間に、東北地方にある養鶏場計2農場の協力を得て、同農場内で養鶏に供されて

いた各9鶏舎、計18鶏舎を対象として、3または4週令から1週毎に出荷時までの間、鶏舎内より新鮮盲腸便をシードスワブ（ニッスイ）を用いて採材し、冷蔵温度帯で輸送した。また、環境材料として、鶏舎間の土壌、鶏舎内作業用長靴の底部、鶏舎内敷料、飼料（前期・後期・仕上げ飼料）をそれぞれ採材し、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) 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50μl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。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。

3) MLST 解析

分離菌株より全DNAを抽出後、*Campylobacter* MLST database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

試験対象農場における、作業員動線・鶏舎配置図・周辺環境図、サンプリング箇所、発育に応じた各飼料成分表等の情報については、各農場を管轄する親会社より提供を受けた。これらの情報と共に、サンプリング時期ごとのカンピロバクター属構成比率変動を加味した各農場配置図を作成した。

5) 菌叢解析

分離培養に供した懸濁残液より、Microbial DNA isolation kit (MO Bio) を用いて DNA を抽出した。その後、16S rRNA 799f-1179r 配列をもとに、タグ・アダプター配列等を付加したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCR 反応を行い、常法に従って、増幅産物を精製した。同精製物については、30 検体を上限として混合ライブラリーを作成し、Ion PGM Sequencing system (Life Technologies) を用いた Pyrosequencing 解析を行った。得られたリードデータは、CLC Genomic Workbench (CLC Bio-Qiagen) を用いてトリミングを行った後、RDP Classifier pipeline を通じて、リード配列の階層付けを行った。その後、Metagenome@KIN プログラム (World Fusion) を用いて、主成分分析およびクラスター解析を行い、サンプル間における菌叢変動に関する情報を収集した。

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

1) 搬入鶏群からのカンピロバクターの検出

1.1) 採材方法

カンピロバクターの検出が確認される 2 農場において、概ね 60 日令で処理場に出荷される鶏群の処理日の 14 日前及び 7 日前の排泄便を農場において採取した。また、処理当日に内臓摘出された際に、盲腸便をそれぞれ 3 羽分ずつ採取した (図 1)。

1.2) 搬入鶏の排泄便と盲腸便の菌数測定

冷蔵保持し 6 時間以内検査に供した。搬送された便 1 g を 10 倍量の PBS にて乳剤とし、10 段階希釈後、Batzler ager (OXOID) を用いた平板希釈法 (二枚法) によりカンピロバクターの菌数を測定した。また、一方で、Preston 増菌培地 (OXOID) を用いて微好气的条件下で、42℃、24 時間培養した。増菌培養液の一部はイムノクロマト法キットに供試し、その菌数を Batzler ager (OXOID) を用いた平板希釈法により培養液中のカンピロバクターの菌数を測定した。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、klena らの方法¹⁰⁾ に従い multiplex-PCR による菌種を同定し、カンピロバクターを確認した。

1.3) イムノクロマトキットによる検出

イムノクロマト法は、市販されているものを使用した。シカイムノテストカンピロバクター II (関東化学(株))、シングルパスカンピロバクター GLISA AOAC (Merk 社)、Singlepath Direct Campylobacter poultry Kit GLISA (Merk 社) および「ポタット」+NH イムノクロマトカンピロバクター (日本ハム(株)) の 4 種類を使用した (図 2)。Singlepath Direct Campylobacter poultry Kit GLISA および「ポタット」+NH イムノクロマトカンピロバクターは、採取便を直接使用した。一方、シカイムノテストカンピロバクター II、シングルパスカンピロバクター GLISA AOAC については、便を PBS で 10% 乳剤化し、1,035×g で 10 分間遠心分離し夾雑物を除去した後、上清を採取した。これを 14,010×g で 10 分間遠心しその沈渣を回収し、10 倍に濃縮されたサンプルをイムノクロマトキットに使用した。また、増菌培養後の菌液についても同様のキットを使用した。

2) エアーチラー設置食鳥処理場 (1.2. の調査とは別の食鳥処理場) への訪問

平成 27 年 2 月 2 日に貞光食糧工業(有)食品工場 (徳島県美馬郡つるぎ町) を訪問し、聞き取り調査および見学を実施した。

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

1) 市販鶏肉のカンピロバクター汚染調査

2014年4月から2015年2月の間に東京・埼玉・茨城・千葉・群馬県下の食肉販売店12店舗から鶏肉30検体(鶏ササミ肉11検体, 鶏モモ肉9検体, 鶏ムネ肉8検体, 鶏こまぎれ2検体)および鶏皮2検体, 心臓-肝臓1検体, 心臓1検体を購入した。これらは購入後、冷蔵保存し、消費期限内に検査に供した。カンピロバクターの分離は検体25gを225mlのPrestonブイヨンに加え、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 25 ± 1 時間、微好気条件下($80\%\text{N}_2$, $10\%\text{CO}_2$, $5\%\text{O}_2$, $5\%\text{H}_2$)で増菌培養後、Butzler寒天培地及びmCCDA寒天培地に塗抹し、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 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個鈎菌し、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、PCR法により菌種の同定を行った。

一般生菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数の測定は検体25gを225mlの滅菌PBSに加え30秒間ストマッカー処理後に得られた懸濁液をスパイラルプレーターを用いて標準寒天培地、VRBG培地、XMG培地に各々 $50\mu\text{l}$ 塗抹し、培養後の発育集落数をカウントした。カンピロバクター検出検体と非検出検体における一般生菌数・腸内細菌科菌群数の比較に際してはt検定を用いて有意差を確認した。

2) 凍結処理によるカンピロバクターの減少効果

2.1) 供試検体

平成26年8月から9月の間に、都内のスーパーマーケットS店でブラジル産皮付き鶏モモ肉10検体およびタイ産皮なし鶏モモ肉15検体、M店でブラジル産皮付き鶏モモ肉5検体およびアメリカ産皮付き鶏モモ肉15検体の合計45検体を購入した。タイ産鶏肉は唐揚げ用にカットされており、アメリカ産鶏肉は骨付きであった。いずれの検体も冷凍輸入品を店舗バックヤードで解凍、個別包装して、販売されていた。

購入後、速やかに 4°C 下にて実験室へ輸送し、試験に供した。

また、国産冷蔵鶏肉検体については、平成26年5-7月に東京都内のスーパーマーケット0店舗にて冷蔵にて市販されていた α 県産銘柄鶏モモ肉15検体及び β 県産銘柄鶏モモ肉15検体を購入した。また、同地区別食品量販店F店舗にて同じく冷蔵温度帯で販売されていた γ 県産銘柄鶏モモ肉15検体を購入した。いずれも、10度以下で実験室に輸送搬入し、試験に供した。

2.2) 増菌培養

ニュートリエントブイヨンNo.2を用いて、検体懸濁液を調整した後、1mLをPCR定量試験用検体として(後述)、さらに1mLを菌体保存用に採取した。残試料はPreston培地中で 42°C で微好気培養を行った。典型集落を鈎菌し、ミューラー-ヒントン寒天培地に塗抹して、 37°C の微好気条件下で48時間培養を行ったのち、Multiplex PCR法を用いた*C. jejuni*及び*C. coli*の遺伝学的同定に供した。なお、輸入冷凍検体・国内冷蔵検体間での検出成績については、カイ二乗検定を用いた有意差解析を行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

2.3) 定量PCR法

調整済懸濁試料1mLより、PrepSEQ® Rapid Spin Sample preparation Kitsを用いてDNA抽出を行い、得られた抽出核酸を鋳型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反応をLightCycler 480 (ロッシュアプライドサイエンス)で行い、カンピロバクターの定量検出を実施した。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

1) 内臓処理場における衛生管理に関する検討

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2胃、第3胃、小腸および大腸について漿膜面の生菌数および大腸菌数を調査し、粘膜面の菌数と比較した。

2) 洗浄による内臓肉表面汚染制御に関する検討

約 10^4 CFU の腸管出血性大腸菌 O157 菌体を牛タン検体 (約 1.4-1.6kg) 表面に接種後、4℃にて1時間保存した。非接種群については、PBS を検体表面に滴下後、同様に保存した。保存後検体については、滅菌済大型ストマッカー袋に入れ、水道水、微酸性電解水、次亜塩素酸ナトリウム水溶液各 2L を注水後、1 分間手揉みを行った。同操作を 1, 2, 3, および 5 回実施した後、検体を取り出し、舌中央部表面部位 25cm² (5cm x 5cm) をふき取り、一般細菌数、腸内細菌科菌群数及び腸管出血性大腸菌 O157 の菌数を直接塗抹法により計数測定した。

3) 牛ミノにおける煮沸湯水を用いた自然汚染指標菌数の低減効果に関する検討

牛ミノブロックを約 100g づつに細断した後、煮沸湯水 (92℃±1℃) を用いた加熱処理群および非加熱処理群に分け、氷上で短時間保存した。加熱処理群については、10, 30, 60 秒の煮沸時間を設定し、予め洗浄・加熱消毒した鍋容器中で 1L の滅菌蒸留水を用いて煮沸操作を行った。加熱後、検体を滅菌済アルミ製ザルで掬い上げ、予め氷上で保存した BPW 100 ml を入れた滅菌ストマッカー袋に加え、氷上で急冷させた。ホモゲナイザーを用いて 1 分間十分に攪拌させた後、100 μl を VRBG およびクロモアガー O157 寒天培地に塗布し、37℃で 20 時間培養後に発育した集落数を求め、D 値算出に供した。

5. と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

1 2 自治体の食肉衛生検査所に勤務すると畜検査員の協力を得て、それぞれの検査所における疾病診断に係る食肉検査を議論し、その中で公益性の高いと畜検査マニュアルの共通化を図る上での問題点を抽出した。また、「敗血症」に関して、現場からの意見を反映させた形で、現行の検査マニュアルの改訂案を作成することとした。

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汚染伝播様式と汚染源推定に関する研究

①出荷時におけるカンピロバクター分離成績および MLST 法による遺伝子型別

平成 26 年 9 月～10 月の間に、東北地方の養鶏農場計 2 か所 (B 農場、E 農場) の協力を得て、当該施設内の計 18 鶏舎 (各 9 鶏舎) より、3 または 4 週令より出荷時令 (7 または 8 週令) の鶏盲腸便および環境材料 (鶏舎周辺土壌、鶏舎内作業用長靴底、飼料 (前期・後期・仕上げ)、敷料) を採材し (計 144 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。また、得られた分離株を対象に、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。

出荷時の盲腸内容由来検体を用いた分離培養により、A 農場の鶏盲腸内容由来の検体については、55.6% (5 検体/9 検体: 1, 2, 5, 6, 7 号舎) の *C. jejuni* 分離陽性率を示した (表 1)。昨年度分離できた *C. coli* は分離できなかった。B 農場由来の検体については、9 検体中 1 検体 (11.1% : 5 号舎) から *C. jejuni* が分離され、異なる 1 検体 (11.1% : 7 号舎) からは、昨年度の検討においては検出されなかった *C. coli* が分離された (表 1)。

MLST 解析の結果、B 農場における鶏盲腸内容由来の分離株の遺伝子型は単一であることが明らかとなったが、本遺伝子型は昨年度の研究においても検出された遺伝子型であった (表 2)。また、E 農場では、*C. jejuni* と *C. coli* の両方が分離されたことから、少なくとも 2 つ以上の侵入経路が存在する可能性も考えられた。E 農場由来の *C. jejuni* 分離株は、昨年度に分離された同菌株と同一の遺伝子型であった (表 2、図 2) ことから、これらが当該農場に常在化していると推察された。

以上より、本研究における供試農場で飼養されたブロイラー鶏は、継続的にカンピロバクターを保菌している実態が明らかとなり、特に出荷時に向けて分離陽性率が急激に増加する傾向が認められた。

②飼養期間別での分離陽性率の比較

経時的な汚染の広がり明らかにし、農場内における蔓延経路を推測するために、出荷時より前の4、5、6週齢時の盲腸内容由来検体を用いた分離を試みた。農場・飼養時期ごとの鶏舎陽性率については表1に示した。B農場において6週齢時に22.2%（2検体/9検体：6、7号舎）の分離陽性率を示した。分離された2鶏舎は、出荷時の検体において分離された5鶏舎（1、2、5、6、7号舎）に含まれていた（図1）。4週齢、5週齢時には分離できなかった。MLST解析の結果、6週齢検体由来株の遺伝子型は出荷時検体由来株の遺伝子型と同一であった。①遺伝子型が同一であること、②6週齢時に陽性であった鶏舎が出荷時に陽性であった鶏舎に含まれていること、③6週齢時に分離できた2鶏舎が隣り合っていること（図1）から、6週齢時において陽性であった鶏舎が水平感染の起点であることが示唆された。E農場においては出荷時以外では検体の別によらず、分離できなかった。

以上より、飼養時（4、5、6週齢）と比較して出荷時における分離陽性率が著しく高いことから、6週齢から出荷までの1~2週間が養鶏におけるカンピロバクター制御において非常に重要な時期であることが示された。この期間は飼料に抗生剤を含まない休薬期間であり、当該因子の関連性も示唆された。

③農場内環境検体からの検出状況

B農場の土壌検体からは、出荷時に2か所から*C. jejuni*が分離された。MLST解析の結果、遺伝子型が盲腸内容由来分離株と同じものと異なるものが認められた。遺伝子型が同じもの（ST-2031）は、盲腸内容から分離できなかった鶏舎間（8、9号舎間）の土壌由来のものであり、*C. jejuni*が農場全体に広がっていると考えられた。また、遺伝子型が異なる*C. coli*分離株が得られたことより、複数経路による侵入が考えられた。一方、出荷時以外の検体から分離することが出来なかった。この結果

は、当該農場においては、鶏同様に6週齢から出荷時までの期間におけるカンピロバクター制御が特に重要であることを示しているともいえよう。また、鶏舎の内外で同遺伝子型の菌を分離できたことは鶏舎外環境から鶏舎への侵入および鶏舎内から鶏舎外への流出が考えられ、鶏舎内での本菌の増幅と、その後の鶏舎間での水平伝播が農場内蔓延の主因であるとする説を支持する結果となった。一方、E農場では、環境検体から本菌は分離されなかった。

④次世代シーケンサを用いた菌叢解析による農場内伝播に関する知見

カンピロバクターの分離培養を行うにあたっては、検体の保存・輸送中に当該菌が死滅・減少することが考えられ、培養成績が必ずしも本菌の所在と一致しない場合も想定される。汚染源の推定を行うにあたって、分離培養の成績を更に検証するため、本研究では、B農場の分離培養に用いた検体からDNAを抽出し、次世代シーケンサ（NGS）を用いた16S rRNA pyrosequencing法に供することで、各盲腸便検体間での構成菌叢の比較を行い、各サンプルに含まれるカンピロバクター属の比率を比較することとした。同解析の結果、カンピロバクター属由来遺伝子は出荷時の盲腸内容由来の全検体において、存在することが示された（表3、図3）。この結果から、分離陰性の検体においても相応の汚染が想定され、出荷時には農場内に蔓延していることが示唆された。また、4週齢で1鶏舎、5週齢で2鶏舎、6週齢で3鶏舎からの検体において本菌の存在が認められ、経時的な感染の拡大が示唆された。

また、6週齢時の検体の中で、分離陽性となった2鶏舎（6、7号舎）のうち、1鶏舎（7号舎）由来の検体では、①5週齢時から本菌が分離されたこと、②経時的に構成比率が増加傾向にあり、出荷時には20%を超える構成比率を認めることが明らかとなった（表3、図3）。

以上の成績より、分離培養成績と矛盾することなく、7号舎が同農場内でのカンピロバクター蔓延の起点であったことが示唆された。

2) ブロイラー鶏におけるカンピロバクターの持続感染に関する研究

①養鶏農場でのカンピロバクター汚染源推定

飼料、斃死雛の遺残卵黄、鶏舎入場前長靴底面、野鳥の糞、ネズミの糞、盲腸便、原水、鶏舎内飲用水からカンピロバクターはどの日齢時にも分離されなかった。45日齢時に2号舎の堆積糞(3月)と貯水槽(9月)から *C. coli* が1株ずつ分離された。MLST解析対象の必須遺伝子を解析した結果、7種類の必須遺伝子番号のうち5種類が一致した。残りの2種類は untypeable であった。シークエンスタイプ(ST)を確定することはできなかったが、堆積糞分離株と貯水槽分離株の遺伝子型は一致した。

②ブロイラー鶏のカンピロバクター持続汚染要因

2008~2012年に農場Aで分離された *C. jejuni* のSTは毎年異なり、CC ST-354が2008年、2009年、2012年に検出された。RFLPパターンは6種(A~F型)に分けられ、毎年異なった。農場Bで2011年4月と6月に連続して飼育された鶏群から分離された *C. jejuni* のSTは異なり、RFLP型も異なった。2012年7月と9月の鶏群では同じSTとRFLP型が続けて検出される場合と異なるSTとRFLPが検出される場合があった。また、CC ST-354が2011年4月、2012年1月、7月、9月に検出され、CC ST-464が2011年6月と2012年9月に検出された。RFLPパターンは5種(A, D, G~I型)に分かれた。CC ST-354に属するST-6849、ST-5721、ST-5265とCC ST-464に属するST-4389、ST-7012は日本でのみ報告があり、ST-6849とST-7012は本研究で初めて検出された。

2. 食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御に

①農場におけるカンピロバクター汚染調査

1) 採取時期別保菌数の比較

カンピロバクター保菌農場における鶏群の菌数を排泄便から求めたところ、A農場では、搬入される14日前、7日前に排泄された菌数は、平均 3.7×10^7 個/g および 2.4×10^6 個/g と違いが見られず、処理

当日に採取された盲腸便の菌数も 4.2×10^7 個/g とほぼ同程度であった。一般的に飼養管理が良好であると思われたB農場においても、搬入される14日前、7日前の排泄された菌数は、平均 2.2×10^5 個/g および 1.7×10^5 個/g と採取日による違いが見られず、処理当日に採取された盲腸便の菌数は 1.9×10^5 個/g とほぼ同程度であった(表3,表4)。

2) 搬入鶏群の排泄便および盲腸便を用いたイムノクロマト法キットによる検出結果

排泄便および盲腸便の検出菌数の多かったA農場では、処理の14日前、7日前及び処理日において、シカイムノテストカンピロバクターII、シングルパスカンピロバクターGLISA AOAC およびNHイムノクロマトカンピロバクターのいずれにおいてもカンピロバクターが検出された。しかしながら、Singlepath Direct Campylobacter poulty Kit GLISA および「ポタット」+NHイムノクロマトカンピロバクターでは検出できなかった。検出菌数の少なかったB農場では、いずれのキットにおいても検出することができなかった。しかしながら、Preston 培地を用いて24時間増菌培養した菌液を用いた場合には、すべてのキットにおいて検出することが可能であった。この時の培養液の菌数は平均 3.0×10^8 個/mlであった(表3)。B農場では、Singlepath Direct Campylobacter poultry Kit GLISA, 「ポタット」+NHイムノクロマトカンピロバクター、シカイムノテストカンピロバクターII およびシングルパスカンピロバクターGLISA AOAC のいずれにおいても便から直接は検出できなかった。盲腸便を採取後、速やかに検査に供したところ、シカイムノテストカンピロバクターII およびシングルパスカンピロバクターGLISA AOAC を用いた場合にのみ検出が可能であった(表4)。

②エアーカー設置食鳥処理場での聞き取り調査

エアーカー設置について:平成2年の食鳥処理場の建て替え時に設置した。中抜きと体の塩素を滴下したチラー水による処理の後に設置している。懸垂フックに中抜きと体を懸垂し $0 \pm 2^\circ\text{C}$ の冷蔵庫内

で30分間維持していた(写真1, 写真2)。特徴として、余剰水分が少なくなることによりと体の歩留りは若干減少することである。公的機関による拭き取り検査では製品のカンピロバクターの汚染率は低いと聞いている。

カンピロバクター汚染の無い鶏肉の生産について：現在、内臓摘出時による腸管の損傷の防止、チラー水の塩素の管理、エアーチラー等によるカンピロバクター汚染の少ない鶏肉の生産を試みている。現在、食鳥処理場の危害としてカンピロバクターの汚染は設定されていないので、カンピロバクターフリーの鶏肉は生産していない。もしもカンピロバクター汚染の無い肉を生産しても、それにみあった対価が得られない状況である。調理段階や喫食段階での加熱調理や二次汚染対策に傾注した方が、食中毒対策として費用対効果の面からもより効果があるのではないだろうか。

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) 市販鶏肉のカンピロバクター汚染調査

カンピロバクターは20%(6/30検体)の鶏肉から分離された。これらの内訳ではササミ肉の27%(3/11検体)、ムネ肉の13%(1/8検体)、モモ肉の11%(1/9検体)、こまぎれの50%(1/2検体)が陽性であった。また、1検体の心臓からカンピロバクターが分離された。鶏皮2検体、心臓&肝臓1検体からは分離できなかった(表1)。分離菌は全て *C. jejuni* であった。

カンピロバクターが検出された6検体の鶏肉の一般生菌数は 5.5×10^5 個/g、腸内細菌科菌群数 2.2×10^5 個/g、カンピロバクター検体されなかった24検体の一般生菌数は 5.2×10^5 個/g、腸内細菌科菌群数は 1.1×10^5 個/g であった(表2)。これらの菌数の差は認められなかった。

2) 輸入冷凍鶏肉及び国産冷蔵鶏肉でのカンピロバクター汚染率の比較検証

輸入冷凍鶏肉及び国産冷蔵鶏肉検体を用いて、カンピロバクター汚染実態を調査した。分離培養法及びPCRによる迅速検査法を用いた定性試験の結果、輸入冷凍検体では45検体中1検体(2.2%)のみが陽性を示した一方、国産冷蔵検体では、45検体中12検体(26.7%)が陽性となった(表2)。

定量PCRアッセイの結果として、分離成績に関わらず、本試験に供した検体はいずれも陰性を示した。本試験の検出限界は、およそ 10^2 CFU/g であることを踏まえ、供試検体におけるカンピロバクター汚染は少なくとも 10^2 CFU/g 以下と推察された。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

内臓処理施設により粘膜面が漿膜面より菌数で1対数個程度多い施設と、漿膜面での菌数が粘膜面のそれと同等かより高い値を認める施設が見られた。洗浄水の交換、処理台の洗浄の頻度が低い処理施設では、粘膜面と漿膜面の一般生菌数および大腸菌数に差が無かった。

5. と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

食肉衛生分野に勤務する12自治体職員の協力を得て、「敗血症」に対する疾病診断マニュアルの在り方を議論した。各検査所の問題点や現行検査マニュアルの問題点を挙げた上で、実用的でわかりやすく、一冊でSOPも包含した形のマニュアルが理想との結論が出された。その上で、敗血症をモデルとして、解説・保留基準・採材方法・類症鑑別・検査方法・判定基準・措置の各項目で改善すべき点を挙げ、改正マニュアル案の作成を行った。公益性の高い食肉検査の現場において、自治体や検査員の差が相応に在る現状を把握したが、マニュアル全体の改正にあたっては、広く自治体・検査員の声を反映させた形での作成を行うことで、こうした差を最小限にとどめることができると考えられた。

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

1) 農場内伝播（汚染）源推定に関する検討

本研究では、昨年度の検討の結果、広範な汚染を顕した農場を対象に、その汚染源と伝播様式に関する知見を得るため、鶏舎及び同周辺環境検体を用いて、時系列（飼養期間）別に汚染率を調べ、出荷時令以前の検体ではほぼ当該菌が分離されないものの、盲腸内菌叢において本菌由来遺伝子はより早期から検出され、同比率は日齢の増加に伴い、徐々に増加傾向にある鶏舎が存在すること、その中においても、特に早期より比率増加が顕著で出荷時には著しい比率を顕す鶏舎が存在することを明らかにした。鶏腸管内において、カンピロバクターは定着を果たし、腸内細菌叢としてその比率を増加させることが知られており、本研究において認められた比率動態に関する知見は、ある鶏舎に早期から本菌が混入し、増幅源となり、周囲鶏舎への汚染源となっていたものと考えられる。同農場内で検出された本菌株の多くが同一遺伝性状を示したことは、水平伝播が蔓延の主因であることを示しており、上述の推論を支持するものと考えられる。

また、出荷時の盲腸検体において、菌叢に占めるカンピロバクター属由来遺伝子の構成比率が高い検体では、低い検体に比べて、明らかな菌叢構成の差異が認められた。こうした菌叢変動がカンピロバクターの鶏宿主での定着に影響を及ぼしたのか、或はカンピロバクター定着が菌叢を変動させたのかについてはいまだ明らかではない。本菌の鶏宿主における動態の解明は、生産現場での制御に結びつく可能性があることから、これに係る更なる検討を進めていきたい。

本年度の協力農場については、昨年度も出荷時においてのみ検討対象としていたが、本研究における分離菌株の遺伝性状は、昨年度とは異なるものも含まれており、農場内でしばしば認められる持続汚染

は、異なる性状の菌株が絶え間なく侵入する疫学状況を示唆しているとも考えられる。

2) ブロイラー鶏におけるカンピロバクターの持続感染に関する研究

飼育農場のカンピロバクター汚染要因をブロイラーの日齢ごとにみると、飼料、使用長靴底面、野鳥や鼠の糞便からカンピロバクターはどの日齢時にも分離されなかったことから、環境が直接汚染要因となる可能性は低いものと考えられた。飼育中のブロイラー盲腸便からも全くカンピロバクターが分離されなかったことから、今回調査を行った農場は通常の農場よりも衛生管理状況が良好であった可能性が考えられる。しかしながら、堆積糞と貯水槽から 45 日齢時に *C.coli* がそれぞれ 1 株ずつ分離されている。このことから、ブロイラーにカンピロバクターが感染する前に鶏舎周辺の環境が何らかの要因でカンピロバクターに汚染されてしまうことが考えられる。本調査では、ブロイラー飼育過程でのカンピロバクター汚染源特定にまでは至らなかったが、その素因に関する一知見が得られた。

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) 採取時期別保菌数の比較

処理場に搬入される鶏群は 60 日齢を目安とされている。このため、区分処理するため、処理場に持ち込まれる 1 週間前には陽性鶏群を特定する必要がある。今回、搬入 14 日前、7 日前及び当日の盲腸便の保菌菌数は、ほぼ同程度であった。このことから、食鳥処理場でとたいの汚染源となる盲腸内容物の保菌状態が、農場での鶏群の排泄便を調べることにより十分推定できることが判明した。

2) 搬入鶏群の排泄便および盲腸便を用いたイムノクロマト法キットによる検出結果

カンピロバクターの保菌状況を把握するため、確立された培養法により検出するためには少なくとも

も2~3日必要である。このことから、検査に要する時間が検体処理から判定まで短時間(おおむね1時間以内)であるイムノクロマト法キットによる検査法を検討した。しかしながら、便1gあたり 10^5 個/gを下回ると、直接便からの検出が難しくなり、増菌培養をおこなわなくては、いずれのキットにおいても検出することが難しくなる。小田¹¹⁾らは、イムノクロマト法キットの検出菌数は 10^6 個/mlであれば十分であるとしているが、簡便なカンピロバクターの増菌培養が可能なキットの開発も必要であると考えられた。

搬入前の養鶏場の段階でカンピロバクターに高度に汚染された鶏群は、食鳥処理場において、施設、他鶏群の処理と体に対してカンピロバクターのリスクを拡大する恐れがある。このため、農場においてイムノクロマト法キットで陽性と判定される高度汚染鶏群については、処理を最後に回し、カンピロバクター非保菌鶏を優先的に処理するという、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。

キットにより、同一サンプルを用いても検出感度に違いが見られることから、市販キットについても用途により選択する必要があると考えられた。

3) エアーチラー設置食鳥処理場での聞き取り調査

多くの生産農家・食鳥処理場でカンピロバクター汚染を減少するための行動が実施されている。しかし、これらの衛生対策に対する対価が得られていないことが、カンピロバクター汚染の無い鶏肉を生産する最大の負の要因であると思われた。

多くの国で食鳥処理場でのカンピロバクター汚染の軽減対策を模索し評価を行っている。いずれも条件が異なり比較することが容易ではない。

Demirok¹²⁾らは塩素濃度が5ppmに維持された $0.5\sim 1.1^\circ\text{C}$ の冷凍チラー水で処理した場合、と体のカンピロバクター数は約 $1/1000$ に減少、 0°C のエアーチラー室内に120分保持した場合、と体のカンピロバクター数は約 $1/10$ に減少すると報告している。今回、日本で稼働しているエアーチラーシス

テムは、塩素を滴下したチラー水による処理の後に $0\pm 2^\circ\text{C}$ のエアーチラー室内で30分間、丸と体をインラインで保持するものであることから、カンピロバクター汚染の軽減に寄与するものと思われた。

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

1) 市販鶏肉のカンピロバクター汚染調査

今回、カンピロバクターは20%(6/30検体)の鶏肉から分離された。平成25年度の調査ではカンピロバクターは鶏皮がついている42%(11/26検体)の鶏もも肉および40%(12/30検体)の鶏ムネ肉から、また6%(2/31検体)の鶏ササミ肉から分離されている。平成25年度、今年度も鶏肉はカンピロバクター汚染があるが、同じ方法で調査したにもかかわらず市販鶏肉の汚染率が減少していた。また、前年度の調査では、モモ肉、ムネ肉はササミ肉よりも高率に汚染されていたが、今年の調査ではササミ肉が最も多く27%(3/11検体)であった。毎年、カンピロバクター食中毒は多発しているため、保健所等もカンピロバクター食中毒防止対策を行っている。このような対策によって市販鶏肉のカンピロバクター汚染率も減少しているのかもしれない。

今回、カンピロバクターが検出された6検体の鶏肉およびカンピロバクターが検出されなかった24検体の鶏肉の一般生菌数や腸内細菌科菌群数を比較したところ、有意差は無かった。鶏肉のカンピロバクター汚染の有無は、鶏肉になってからの衛生的な取扱いではなく、鶏肉になった段階でカンピロバクター汚染があるかないかに左右されていると思われた。

2) 輸入冷凍鶏肉及び国産冷蔵鶏肉でのカンピロバクター汚染率の比較検証

輸入鶏肉は、船舶輸送されるため、ほとんどが冷凍状態で流通される。本研究班では、過去2年間で、冷凍処理の汚染低減効果を添加回収試験或は自然汚染検体を用いた冷凍条件下での汚染率低減に関

する知見を集積してきた。本研究の成果は、これを支持するものといえ、今後、冷凍処理の応用は鶏肉におけるカンピロバクター汚染を流通段階で制御する一手法となりうると目される。一方で、昨年度までの実証データは、研究用冷凍機器を用いて行われていることから、産業用実用冷凍（凍結）装置を用いた検証が、その応用性を図る上では求められよう。また、馬肉にあるような短時間の冷凍処理が鶏肉におけるカンピロバクター制御にどの程度作用するかを明らかにしていく必要があると考える。

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。粘膜面の汚染が漿膜面に移行していることが明らかな処理場では、処理台の洗浄不足、溜水による洗浄などが行われていた。汚染菌数の低い処理施設では、一頭毎に処理台の洗浄を行い、流水洗浄で水槽の水を頻繁に交換していた。

また、牛タン表面における細菌汚染低減に関する検討では、微酸性電解水が、次亜塩素酸水や水道水に比べて、より速やかな菌数低減効果を示した。電解水の内部浸透性は次亜塩素酸に比べ弱いとされている一方で表面での効果発現はより速やかと解される。本研究の成績は、したがって、牛タン検体における細菌汚染分布は概ね外表面に限定されることを示唆しているといえよう。また、牛ミノを用いた自然汚染指標菌数の低減に資する煮沸条件に関する検討成績は、調理段階にあつて少なくとも1分間の煮沸処理が当該検体に対して望ましいという結論を導くものと考えられた。

5. と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

12自治体職員間での協議の中では、各自治体の人員・検査方法・環境等の違いから、本来全国的に統一されているべき、公益性の高い、と畜検査に大きな相違がみられた。従って、マニュアルは各自治

体の現状にあつたものが求められている現状を再認識する機会となったが、一方で、今後、本研究のような多数の自治体の意見を議論した上で作成、反映させた検査マニュアルが疾病ごとに作成され、それをまとめた形でと畜検査マニュアルが全国的に普及することになれば、自治体・検査員の差異を最小限にできるものとなるであろう。

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

1) 農場内伝播（汚染）源推定に関する検討

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。経時的な汚染実態の把握を分離培養法と遺伝学的手法を組み合わせることで、汚染源となった鶏舎の推定を行うことができた。環境での分離時期は鶏盲腸便に遅れて認められたことから、土壌等が初発的な汚染源として鶏舎への本菌伝播を介在した可能性は低いと想定された。盲腸菌叢は、発育期に応じて大きく変動し、出荷時におけるカンピロバクター属菌と一部菌属の構成比率は一定の関連性を示す知見が得られたことから、今後、菌叢に根差した制御対策の実行可能性が期待される。

2) ブロイラー鶏におけるカンピロバクターの持続感染に関する研究

ブロイラー飼育農場に搬入直後のヒナは通常カンピロバクター陰性であり、一般的には3週令以降に陽性に転じると報告されている。本研究では29、31、43日齢時のいずれの材料からもカンピロバクターは分離されなかった。また、45日齢時に*C. coli*が2株しか分離されなかったことから、検査した鶏舎内は比較的清浄に保たれていたと考えられる。

45日齢時に2号舎の堆積糞と貯水槽から分離された*C. coli*を遺伝子型別した結果、遺伝子型は一致したことから両者には関連があると考えられる。本研究で野鳥の糞からカンピロバクターは分離されなかった。しかし、野鳥の糞、ハエの体表、鶏舎

内外の空気、農場の土壌、環境中の水からカンピロバクターが分離された報告がある。農場内で野鳥が糞を落とす、ハエが接触する、空気中の菌が風に乗って運ばれる、汚染された水や土の上を人や車両が行き来するなどの経路によって、*C. coli*が鶏舎外にある堆積糞と貯水槽に媒介され、汚染した可能性が考えられる。

同一農場から分離された *C. jejuni*株を遺伝子型別した結果、5年間すべて遺伝子型が異なった。連続して飼育された鶏群から分離された *C. jejuni*株では、直前の鶏群とは異なる遺伝子型と同じ遺伝子型が検出された。このことから、鶏舎内に特定の遺伝子型の *C. jejuni*が持続的に定着しているのではなく、鶏群が入れ替わるごとに遺伝子型も変わることが分かった。

他の報告では1鶏群から6種類の RFLP 型が検出されている。しかし、本研究で調査した10鶏群のうち3鶏群が3株中1株の遺伝子型が異なり、残りの7鶏群は3株すべて同じ遺伝子型であった。このことから特定の遺伝子型の *C. jejuni*が鶏群全体に感染する可能性が高いと考えられる。

MLST 法による菌の遺伝子解析はインターネット上のデータベースにより国、年、由来の異なる菌株を比較することができる。本研究で8株検出された ST-354 は1984年以降、ルクセンブルク、インド、アメリカなど多くの国で鶏、七面鳥、人、羊、子牛、環境水から検出され、日本では人と鶏から報告されている。現在 ST-354 は鶏から最も多く検出されている。また、ST-464 は2001年に日本で人から分離されて以降、世界的に拡大し、現在鶏からの検出数が最も多い。このことから、保菌動物に特異的な ST が存在し、ST-354 と ST-464 は鶏と関係があると考えられる。

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

処理場に搬入される鶏群のカンピロバクター汚染の程度は、培養法により得られた保菌菌数から、搬入の14日前から処理当日までほとんど同じであ

った。市販イムノクロマト法キットにより、検査時間が1時間以内となり培養法に比べ著しく短縮が可能であった。しかしながら、菌数が 10^6 個/gでなければ検出されないことがある。このため、増菌培養を行うことで、イムノクロマト法キットを用いた、農場での汚染鶏群と非汚染鶏群の判別が可能であると考えられた。キットによる検査を確実なものとするため、一定の処理により、サンプル中の菌数を確保する必要があると考えられた。

農場において、高度にカンピロバクターを保菌する鶏群を把握し、区分処理することにより、食鳥処理場でのカンピロバクターの汚染の拡大を防止することが可能であると考えられた。

多くの生産農家・食鳥処理場でカンピロバクター汚染を減少するための行動が実施されているが、鶏肉の衛生度が対価として得られていない現状であった。

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

市販鶏肉はカンピロバクター汚染されているが、その汚染率は年や産地等によって異なっていることが判明した。

輸入冷凍鶏肉は国産冷蔵鶏肉に比べて、汚染率が有意に低い傾向が改めて確認され、冷凍処理によるカンピロバクター汚染制御効果を支持するものとなった。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

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。その際のポイントとして

1. 一頭毎に処理台を洗浄する。
2. 洗浄水を適切な頻度で交換する。
3. 大腸を切開する際の内容汚染を漿膜面に拡大しない。

等の点が考えられたが、それぞれの処理施設の構造・設備を変更しないと達成できないものもことから、共通のマニュアル化は困難と考えられた。

牛タンを洗浄する際には、表面での細菌汚染を主眼に置いた上で、速効性を示す洗浄溶媒の使用が望ましいと考えられた。また、牛ミノを煮沸する際には、少なくとも1分間の同処理が望ましいとの結論を得た。

5. と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

12自治体の食肉衛生検査所職員の協力を得て、敗血症を一例として、様々な検査所で使用できるよう、現場の意見を取り入れた形でのマニュアル案を作成した。その上で、多数の自治体の声を反映させた形での改善が今後求められるとの結論が得られた。

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. pp.177-188.

2. 論文

該当なし

H. 知的財産権取得状況

該当なし