

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25年度の調査では市販鶏肉のカンピロバ  
クター調査および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。平成26年度は、市販鶏  
肉のカンピロバクター調査ならびに処理場での交  
差汚染を最小限度にするため、非汚染鶏群を、  
汚染鶏群より優先して処理すること(区分処理)を  
実行するため、農場における汚染鶏群と非汚染  
鶏群の有効な判別方法を探る目的で、市販され  
ているイムノクロマト法キットが、農場での迅速診  
断に活用し得るのか検討した。さらに、エアーチラ  
ー設置食鳥処理場を訪問してカンピロバクター汚  
染軽減策等について聞き取り調査を実施した。

#### 引用文献

- 1) Ono, K.; Yamamoto, K. Contamination of meat  
with *Campylobacter jejuni* in Saitma. 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/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)

## B. 研究方法

### 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・千葉県・群馬県の食肉販売店 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)を  
購入した。また、鶏皮 2 検体, 心臓&肝臓 1 検体,  
心臓を 1 検体購入した。これらを購入後、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 ブイオンに加え、42±1°C, 25±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 m CCDA に塗抹し、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $48\pm 2$  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>9)</sup>が報告したPCR法を用いて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のを実施した。その後、スパイラルプレーター(Eddy Jet: Iul Instrument 製)を用いて、一般生菌数は標準寒天培地に、腸内細菌科菌群はVRBG培地に、大腸菌群数と大腸菌数はXMG培地に各々50 $\mu\text{l}$ 塗抹した。標準寒天培地およびVRBG培地は $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $24\pm 2$ 時間、XMG培地は $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $48\pm 4$ 時間培養を実施し、出現した集落については自動菌数測定装置(aCOLyte: Synbiosis 製)を用いて菌数を算出した。

カンピロバクター検出検体と非検出検体の一般生菌数、腸内細菌科菌群数についてはt検定を実施し有意差(危険率5%未満)を確認した。

## 2. 食鳥処理に搬入される鶏群からのカンピロバクターの検出

### a) 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)。

### b) 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1gを10倍量のPBSにて乳剤とし、10段階希釈後、Butzler agar(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)を用いて微好気的条件下で、 $42^{\circ}\text{C}$ 、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 Butzler agar(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<sup>10)</sup>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。

### c) 市販イムノクロマト法キットによるカンピロバクターの検出

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、 $1,035\times\text{g}$ 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 $14,010\times\text{g}$ 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。

## 3. 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)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。

## 引用文献

- 9) 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.
- 10) 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.

## C. 研究結果

### 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%), 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  $5.5 \times 10^5$  個/g、腸内細菌科菌群数  $2.2 \times 10^5$  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  $5.2 \times 10^5$  個/g、腸内細菌科菌群数は  $1.1 \times 10^5$  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. 農場におけるカンピロバクター汚染調査

#### a) 採取時期による保菌されている菌数

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  $3.7 \times 10^7$  個/g および  $2.4 \times 10^6$  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  $4.2 \times 10^7$  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  $2.2 \times 10^5$  個/g および  $1.7 \times 10^5$  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  $1.9 \times 10^5$  個/g とほぼ同程度であった(表3,表4)。

#### b) 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 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  $3.0 \times 10^8$  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)。

### 3. エアークララー設置食鳥処理場(1.2.の調査とは別の食鳥処理場)の聞き取り調査

エアークララー設置について: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クラ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、クララー水の塩素の管理、エアークラ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、それの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。

## D. 考察

### 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. 農場段階でのカンピロバクター汚染の把握

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。

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<sup>11)</sup>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(1.2.の調査とは別の食鳥処理場)における聞き取り調査

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。Demirok ら<sup>12)</sup>は塩素濃度が 5ppm に維持された 0.5~1.1℃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℃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±2℃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。

引用文献

11)小田隆弘, 古田宗宜, 徳永章子, 樋脇弘. 二段階増菌方法とイムノクロマト法キット“シカイムノテストカンピロバクターⅡ”を併用した鶏肉類からの *Campylobacter jejuni/coli* の簡易迅速検出法の有効性の検討. 日本食品微生物学会誌. 2012, 29(2), 124-132.

12) Demirok E, Veluz G, Stuyvenberg WV, Castañeda MP, Byrd A, Alvarado CZ. Quality and safety of broiler meat in various chilling systems. *Poult Sci.* 2013 Apr; 92(4):1117-1126

## E. 結論

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

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<sup>6</sup> 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。

## F. 研究発表

**1. 論文発表等**

なし

**2.学会等発表**

森田幸雄, 食鳥処理場でのカンピロバクター汚染実態, 第7回日本カンピロバクター研究会総会, 平成26年12月12日(金), 国立医薬品食品衛生研究所

**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

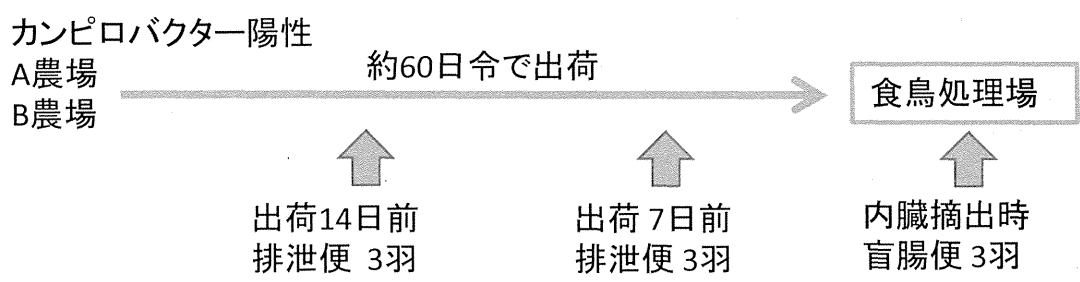


図 1 検体採取方法

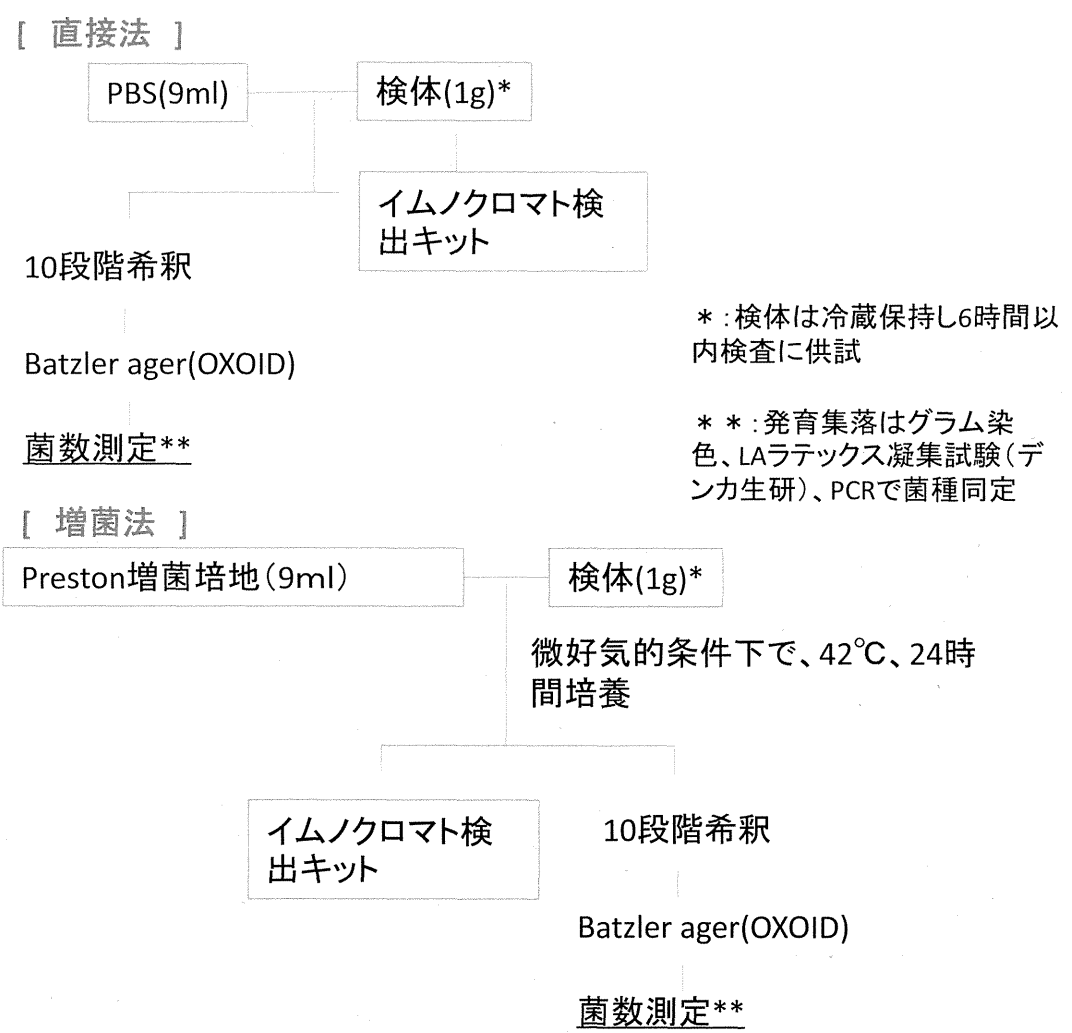


図 2 直接法・増菌法の検査方法

表 1 市販鶏肉等からのカンピロバクター検出状況および一般生菌数等の状況

肉種・部位等	検体数	カンピロバクター		一般生菌数		腸内細菌科菌群		大腸菌群		大腸菌	
		陽性検体数	陽性検体数	平均菌数*	陽性検体数	平均菌数	陽性検体数	平均菌数	陽性検体数	平均菌数	
鶏肉	30	6	30	$5.2 \times 10^5$	30	$1.3 \times 10^5$	28	$4.6 \times 10^4$	10	$8.8 \times 10^3$	
ササミ肉	11	3	11	$5.0 \times 10^5$	11	$1.7 \times 10^5$	11	$5.5 \times 10^4$	3	$1.1 \times 10^4$	
モモ肉	9	1	9	$6.5 \times 10^5$	9	$2.2 \times 10^5$	8	$4.1 \times 10^4$	4	$5.6 \times 10^3$	
ムネ肉	8	1	8	$4.3 \times 10^5$	8	$6.1 \times 10^4$	7	$5.0 \times 10^4$	3	$1.3 \times 10^4$	
こまぎれ	2	1	2	$5.8 \times 10^5$	2	$4.6 \times 10^4$	2	$2.5 \times 10^4$	0	-	
鶏皮	2	0	2	$8.5 \times 10^5$	2	$3.4 \times 10^5$	2	$2.1 \times 10^5$	1	$4.0 \times 10^4$	
心臓&肝臓	1	0	1	$8.9 \times 10^6$	1	$9.8 \times 10^4$	0	-	0	-	
心臓	1	1	1	$1.0 \times 10^6$	1	$1.0 \times 10^4$	1	$1.0 \times 10^4$	0	-	

\*：陽性検体の対数平均菌数



表 2 カンピロバクター検出・非検出の市販鶏肉の一般生菌数等

カンピロバクター 検出の有無	肉種・部位 等	検体数	一般生菌数		腸内細菌科菌群		大腸菌群		大腸菌	
			陽性検 体数	平均菌数*	陽性検 体数	平均菌数	陽性検 体数	平均菌数	陽性検 体数	平均菌数
カンピロバクター検出										
	鶏肉	6	6	$5.5 \times 10^5$	6	$2.2 \times 10^5$	6	$7.2 \times 10^4$	3	$6.2 \times 10^3$
	ササミ肉	3	3	$3.4 \times 10^5$	3	$1.7 \times 10^5$	3	$4.2 \times 10^4$	1	$4.0 \times 10^3$
	モモ肉	1	1	$2.9 \times 10^5$	1	$1.7 \times 10^5$	1	$9.2 \times 10^4$	1	$2.0 \times 10^3$
	ムネ肉	1	1	$8.3 \times 10^5$	1	$6.1 \times 10^5$	1	$2.5 \times 10^5$	1	$3.0 \times 10^4$
	こまぎれ	1	1	$1.5 \times 10^6$	1	$2.6 \times 10^5$	1	$7.8 \times 10^4$	0	-
カンピロバクター非検出										
	鶏肉	24	24	$5.2 \times 10^5$	24	$1.1 \times 10^5$	22	$4.1 \times 10^4$	7	$1.0 \times 10^4$
	ササミ肉	8	8	$5.4 \times 10^5$	8	$1.7 \times 10^5$	8	$6.1 \times 10^4$	2	$8.0 \times 10^3$
	モモ肉	8	8	$7.1 \times 10^5$	8	$2.3 \times 10^5$	7	$3.7 \times 10^4$	3	$7.8 \times 10^3$
	ムネ肉	7	7	$3.9 \times 10^5$	7	$4.4 \times 10^5$	6	$2.0 \times 10^4$	2	$1.3 \times 10^4$
	こまぎれ	1	1	$2.3 \times 10^5$	1	$8.0 \times 10^3$	1	$8.0 \times 10^3$	0	-

\*: 陽性検体の対数平均菌数

表 3 A農場における鶏群のカンピロバクター検出状況

項目	採材日 検体の調整	処理14日前(排泄便)		処理7日前(排泄便)		処理当日 (盲腸便)	
		直接法	増菌法	直接法	増菌法	直接法	増菌法
平均菌数(個/g・ml)		$3.7 \times 10^7$	$2.5 \times 10^8$	$2.4 \times 10^6$	$8.9 \times 10^8$	$4.2 \times 10^7$	$3.0 \times 10^8$
シカイクノテスト 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		+	+	+	+	+	+
「ポタット」+ NHイムノクロマトカンピロバクター		+	+	-	+	-	+
Singlepath Direct Campy Poultry Kit GLISA M		-	+	-	+	-	+
+		検出		-		不検出	

表 4 B農場における鶏群のカンピロバクター検出状況

項目	採材日 検体の調整	処理14日前(排泄便)		処理7日前(排泄便)		処理当日 (盲腸便)	
		直接法	増菌法	直接法	増菌法	直接法	増菌法
平均菌数(個/g・ml)		$2.2 \times 10^5$	$1.9 \times 10^8$	$1.7 \times 10^5$	$8.8 \times 10^7$	$1.9 \times 10^5$	$6.3 \times 10^8$
シカイクノテスト 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		-	+	-	+	+	+
「ポタット」+ NHイムノクロマトカンピロバクター		-	+	-	+	-	+
Singlepath Direct Campy Poultry Kit GLISA M		-	+	-	+	-	+
+		検出		-		不検出	

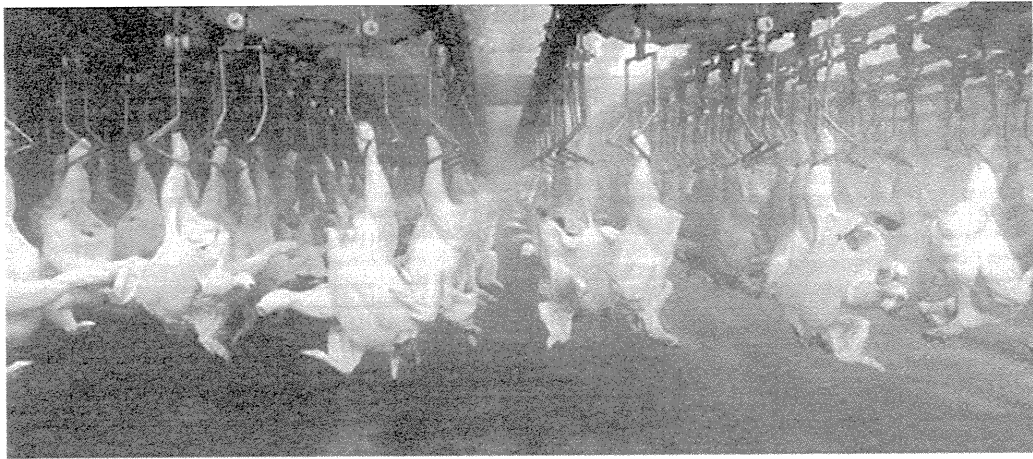


写真 1 エアーチラー内部

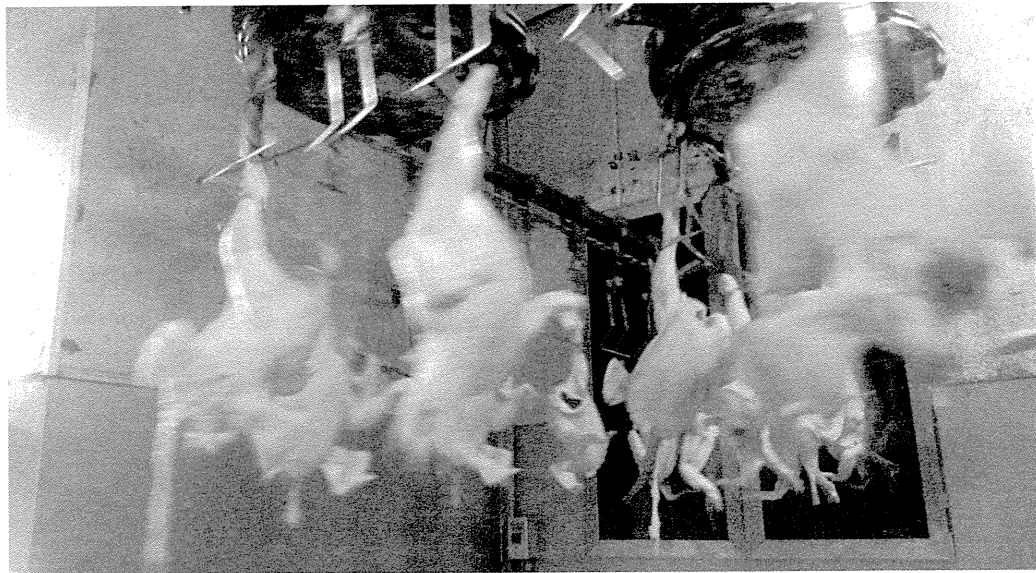


写真 2 エアーチラーからの搬出部

分担研究課題「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」

分担研究者 朝倉宏	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究協力者 山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究協力者 五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

カンピロバクター食中毒において、鶏肉は主要な原因食品として認識されている。我が国の鶏肉消費量のおよそ3分の1は輸入冷凍鶏肉で占められており、冷凍輸入鶏肉からのカンピロバクター検出率は国内流通品に比べて、低いと目されている。本研究では、これまで冷凍処理に伴う鶏肉中での当該菌の生存挙動に着目した検討を行ってきており、本年度は国内冷蔵(チルド)流通製品と輸入冷凍製品を対象として、カンピロバクター汚染実態を相対的に比較することとした。

ブラジル・タイ・アメリカ産の輸入冷凍鶏肉製品計45検体ならびに国内で生産され、冷蔵で輸送・市販される3銘柄鶏肉計45検体を試験対象とした。分離培養成績として、輸入冷凍検体では45検体中1検体(2.2%)のみが陽性であったのに対し、国内冷蔵検体では45検体中12検体が陽性を示した(26.7%)。リアルタイムPCR法を用いた検体内汚染菌数の定量検出を試みたが、いずれも陰性を示し、供試検体における汚染菌数は生存性に関わらず、概ね $10^2$ CFU/g以下と推定された。

A. 研究目的

我が国で発生する細菌性食中毒の中で、カンピロバクター食中毒の発生件数は最も多い傾向が続いている。本食中毒の原因菌であるカンピロバクター(*C. jejuni*および*C. coli*)は、鶏や牛等の家禽や家畜の腸管内に広く分布しており、こうした食鳥肉・食肉の処理工程を通じた交差汚染等を通じて、発生リスクが高まると想定されている。本食中毒における原因食品としては、鶏肉が最も高い割合であることが、近年の分子疫学研究の進展に伴い明らかになりつつある。実際に我が国においても、こうした傾向はみられており、本食中毒の低減に資する農場・食鳥処理・流通の各段階における総合的な制御対策が求められてい

る。

本分担研究では、これまでに流通段階における応用的制御対策として、冷凍処理が海外3か国(アイスランド、デンマーク、ニュージーランド)において実践されていること、そして実施にあたっての実用性にも富んでいること等から、その有効性を検証するため、国産鶏肉検体を用いた添加回収試験及び自然汚染検体を用いた低減効果の経時的検証等を行い、同処理の汚染低減効果が確実性に富むことを示してきた。

わが国の鶏肉消費量の約3分の1は輸入品で占められており、農林水産省の調査によると、平成24年度の国別輸入量ではブラジルが38億9千トンと最も多く、続いてアメリカが2億7千トンであっ

た<sup>1)</sup>。一方、中国やタイからの輸入量も増加傾向にあったが、平成14年度以降、高病原性鳥インフルエンザの発生をはじめ、多々の食品衛生上問題の影響により、輸入量が大幅に減少している。これまでの研究報告では、国内産鶏肉におけるカンピロバクター汚染を調査しているものは多く存在するが、国外からの輸入鶏肉に関するデータは乏しい。

本年度は、こうした知見に関連する更なる確証を得ることを目的として、輸入冷凍鶏肉および国内冷蔵鶏肉それぞれにおけるカンピロバクター汚染実態を比較することとしたので、報告する。

本研究では、一般流通している輸入鶏肉におけるカンピロバクター汚染実態を把握し、そのリスク管理を行うことを目的とする。対象とするカンピロバクター菌種は、食中毒発生時にヒトから分離されるカンピロバクター・ジェジュニ(以下、*C. jejuni*)及びカンピロバクター・コリ(以下、*C. coli*)とした。また、分離培養による定性試験とpolymerase chain reaction(PCR)法による迅速検査を用いたカンピロバクター陽性率を比較し、その有用性を検証する。

## B. 研究方法

### 1. 供試検体

平成26年8月から平成26年9月に、東京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℃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7-8月に東京都内のスーパーマーケットO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度以下で実験室まで輸送搬入し、試験に供した。

### 2. カンピロバクターの分離培養

#### 2.1. 増菌培養

検体の処理手順を、図1に示した。購入した検体の一部を開封してニュートリエントブイオンNo.2(メルクーミリポア)10 mLを添加し、全体に行き渡らせた後、回収した溶液を懸濁試料とした。得られた試料の1 mLをPCR定量試験用検体として、さらに1 mLを菌体保存用として採取し、それぞれ後述の操作に供した。残った試料を10 mLにメスアップし、5%馬脱繊維血液(日本バイオテスト研究所)、カンピロバクター発育サプリメント及びプレストンカンピロバクター選択サプリメント(メルクーミリポア)を添加し、損傷細菌の回復培養として30℃の好気条件下で3~4時間培養を行った。カンピロバクター発育サプリメントは、ピルビン酸ナトリウム(和光純薬)0.25 g/mL、メタ重亜硫酸ナトリウム(関東化学)0.25 g/mL及び硫酸第一鉄(和光純薬)0.25 g/mLを、プレストンカンピロバクター選択サプリメントは、ポリミキシンB(シグマアルドリッチ)20 mg/mL、リファンピシン(和光純薬)10 mg/mL、トリメプリーム(和光純薬)10 mg/mL及びシクロヘキシミド(和光純薬)100 mg/mLを添加した。その後、42℃に移し、好気下で48時間培養を行った。好気培養には、角型ジャーとアネロパック・好気(三菱ガス化学)を用いた。

#### 2.2. 分離培養及び確認試験

増菌培養後、一白金耳量をmCCDA寒天培地(関東化学)に画線塗抹し、42℃の好気条件下で48時間培養をした。典型集落が認められたものを釣菌し、ミューラーヒントン寒天培地(日本BD)に塗抹して、37℃の好気条件下で48時間培養

を行った。

*C. jejuni*及び*C. coli*の同定には、これらの菌種に特異的なプライマーによるマルチプレックスPCR法を用いた。菌株のゲノムDNAは、ボイル法を用いて、以下の手順で抽出した。500 mLの滅菌ミリQ水に各菌株を懸濁し、95°Cで10分間の熱処理を行った。15,000 × rpmで10分間遠心分離して得られた上清をゲノム抽出液とし、PCRのテンプレートDNAとした。PCR反応にはGoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (プロメガ)を用いた。反応液は、1 × GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix、プライマー各0.8 μM及びテンプレートDNA 1 μLを混合し、滅菌ミリQ水で25 μLにメスアップした。用いたプライマーは、表1に示した<sup>2)</sup>。PCR条件は、98°C5分の熱変性ステップの後、98°C10秒、59°C25秒、68°C30秒を30サイクル行い、68°C5分の伸長ステップを行った。PCR増幅産物の有無は、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度1.5%、135 V)により確認した。分子量マーカーは、100-bp DNA Ladder(シグマアルドリッチ)を用いた。同定菌株は-80°Cにて保存した。

### 3. PCRによるカンピロバクターの迅速検査法

上記2.1.で調整した懸濁試料1 mLより、PrepSEQ<sup>®</sup> RapidSpin Sample preparation Kits (Life Technologies)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)中で行い、カンピロバクターの定量検出を実施した。

### 4. 統計処理

輸入冷凍検体・国内冷蔵検体間での検出成績については、カイニ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。

## C. 研究結果

### 1. 分離培養法とPCRを用いた迅速検査法によるカンピロバクター陽性率の比較

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102CFU/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<sup>2</sup>CFU/g以下と推察された。

### D. 考察

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。

表1. 本研究において用いたプライマーリスト

プライマー	配列(5'→3')	サイズ (bp)	標的遺伝子	参考文献
23SF	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG	650	<i>C. jejuni</i> 23S rRNA	2)
23SR	ATCAATTAACCTTCGAGCACCG			
CCF	GTA AACCAAAGCTTATCGTG	126	<i>C. coli glyA</i>	2)
CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG			
CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	323	<i>C. jejuni hipO</i>	2)
CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC			

表2. カンピロバクター検出成績

産地	形状及び部位	検体数	陽性数(%)	
			分離培養	PCR
ブラジル産	皮付き・モモ肉	15	1 (10)	0 (0)
タイ産	皮なし・カット済み	10	0 (0)	0 (0)
ブラジル産	皮付き	10	0 (0)	0 (0)
アメリカ産	皮付き・骨付き	8	0 (0)	0 (0)
		45	1 (2.2)	0 (0)
		45	1 (2.6)	0 (0)
G 県産	皮付き・モモ肉	15	4 (26.7)	0 (0)
S 県産	皮付き・モモ肉	15	3 (20)	0 (0)
T 県産	皮付き・モモ肉	15	5 (33.3)	0 (0)
小計		45	12 (26.7)	0 (0)

ニュートリエントブイヨンNo.2を添加し、  
懸濁溶液を調整

懸濁溶液を回収



残った試料を採取  
分離培養用

1 mLを採取  
定量 PCR 試験

10 mLにメスアップ  
5%馬脱繊維血液及びサプリメントを添加

分離培養(定性)

図1. 供試検体の処理手順



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

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食品科学専攻

研究要旨

牛内臓肉に関する衛生管理の中でも、白物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元来存在している。本研究では、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た。平成26年度は内臓処理施設及び第2胃、第3胃、小腸、大腸について一般生菌数と大腸菌数を測定し粘膜面と漿膜面の菌数について検討した。その結果、内臓処理施設により粘膜面が漿膜面より菌数で1対数個程度多くなる傾向があった。施設の衛生状態を保つためには、少なくとも一頭毎に処理台の洗浄を行い、溜水を止め、オーバーフローを行う場合も頻繁に水を交換する必要があることが明らかとなった。

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  
小野聡美 宮城県食肉衛生検査所  
山本隆宏 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  
谷 泉乃 鳥取県食肉衛生検査所  
渡辺友子 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、内臓肉の細菌汚染状況を調査することにより、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、大腸菌を調査し、粘膜面の菌数と比較した。

C. 研究結果

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。

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。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。

#### E. 結 論

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あることから、共通のマニュアル化は困難と考えられた。

#### F. 健康危機情報

該当無し

#### G. 研究発表

該当なし

#### H. 知的財産権取得状況

該当なし

表1 粘膜面と漿膜面の生菌数及び大腸菌数の処理施設毎の比較

部位	処理施設	一般生菌数		大腸菌数	
		CFU/g		CFU/g	
		粘膜面	漿膜面	粘膜面	漿膜面
第二胃	A	$6.9 \times 10^5$	$3.7 \times 10^4$	$6.2 \times 10^5$	$2.1 \times 10^3$
	B	$5.7 \times 10^4$	$6.0 \times 10^3$	$4.8 \times 10^2$	$1.7 \times 10^2$
	C	$2.7 \times 10^3$	$2.1 \times 10^4$	$7.6 \times 10^2$	$6.9 \times 10^2$
	D	$1.2 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$
	E	$4.0 \times 10^5$	$1.3 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$8.8 \times 10^2$
	F	$1.5 \times 10^5$	$3.2 \times 10^3$	$8.9 \times 10^2$	$1.7 \times 10^2$
第三胃	A	$1.3 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	ND	ND
	B	$1.9 \times 10^5$	$1.7 \times 10^4$	$8.4 \times 10^2$	$2.0 \times 10$
	C	$1.9 \times 10^3$	$1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$
	D	$2.4 \times 10^3$	$1.2 \times 10^6$	$4.1 \times 10^2$	$3.0 \times 10^3$
	E	$8.4 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$2.5 \times 10^3$	$5.7 \times 10^2$
	F	$2.2 \times 10^4$	$4.2 \times 10^3$	$7.7 \times 10$	$1.3 \times 10$
小腸	A	$1.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$5.8 \times 10^3$	$3.8 \times 10^2$
	B	$5.6 \times 10^4$	$2.3 \times 10^3$	$3.2 \times 10^4$	$4.7 \times 10$
	C	$9.6 \times 10^3$	$3.3 \times 10^4$	$6.0 \times 10^2$	$3.3 \times 10^3$
	D	$1.9 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$5.7 \times 10^2$	$2.1 \times 10$
	E	$1.4 \times 10^4$	$6.8 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$
	F	$7.9 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	$3.2 \times 10^2$	$4.1 \times 10$
大腸	A	$1.4 \times 10^4$	$2.4 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$4.1 \times 10^2$
	B	$2.7 \times 10^4$	$1.4 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$	$1.7 \times 10^2$
	C	$4.3 \times 10^3$	$7.7 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$
	D	$1.2 \times 10^4$	$6.5 \times 10^4$	$9.3 \times 10^2$	$2.8 \times 10^5$
	E	$1.2 \times 10^4$	$8.2 \times 10^3$	$2.9 \times 10^3$	$5.0 \times 10$
	F	$1.9 \times 10^4$	$4.5 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$

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

分担研究報告書

牛内臓肉の衛生管理に関する研究

牛内臓肉の洗浄および加熱処理に関する検討

分担研究者 朝倉宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
分担研究者 山本茂貴 東海大学海洋学部水産学科食品科学専攻  
研究協力者 山本詩織 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
研究協力者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

牛内臓肉に関する衛生管理の中でも、白物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元来存在している。本研究では、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た。平成26年度は内臓処理施設及び第2胃、第3胃、小腸、大腸について一般生菌数と大腸菌数を測定し粘膜面と漿膜面の菌数について検討した。その結果、内臓処理施設により粘膜面が漿膜面より菌数で1対数個程度多くなる傾向があった。施設の衛生状態を保つためには、少なくとも一頭毎に処理台の洗浄を行い、溜水を止め、オーバーフローを行う場合も頻繁に水を交換する必要があることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究は、牛内臓肉の中で、特にタン(舌)表面の細菌汚染を低減するための洗浄方法に関する知見を得ると共に、牛ミノの調理段階にあって望ましい煮沸条件に関する知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 牛タンにおける洗浄効果に関する検討

カット前の牛タン1頭分を1検体として、検体表面に約 $10^4$ CFUの腸管出血性大腸菌O157を添加し、4度で1時間冷蔵保存した。非接種対照群としてはPBSを接種後、同様に保存したものを用いた。いずれも保存後は、滅菌大型ストマッカー

袋に入れ、2Lの水道水、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(100ppm)、または微酸性電解水(有効塩素濃度50ppm)を用いて、1, 2, 3, 5回洗浄操作を行った。洗浄後溶媒は、デカンタで廃棄し、検体を取り出した後、上部表面5x5cm領域をふき取り、PBS懸濁溶液を標準寒天培地、VRBG寒天培地、及びクロモアガーO157寒天培地に直接塗抹することで、一般細菌数、腸内細菌科菌群、O157菌数を求めた。各試験群はN=3とした。同試験ワークフローについては図1に示した。

2. 牛ミノにおける煮沸条件の検討

牛ミノロックを100gずつの小ブロックに切り分け、供試検体とした。同検体の内訳は、対照群(未接種・非処理)5検体のほか、煮沸湯水( $92\pm 1^\circ\text{C}$ )を用いた加熱処理群(各15検体)の