

201426009B

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24-26年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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. 分担総合研究報告

#### 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

----- 27

- 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

----- 49

#### 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

----- 63

#### 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

- 流通段階におけるカンピロバクター制御に関する研究  
朝倉 宏 他

----- 75

#### 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

----- 91

- 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

朝倉 宏、山本 茂貴 他

----- 95

#### 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

----- 101

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 113

平成24-26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  
大畑 克彦 静岡県西部食肉衛生検査所  
岡野 純 宮城県食肉衛生検査所  
梶川 典子 神奈川県食肉衛生検査所  
梶田 弘子 岩手県食肉衛生検査所  
川久 通隆 兵庫県食肉衛生検査センター  
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  
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  
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  
下村 高司 宮崎都濃食肉衛生検査所  
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  
谷 泉乃 鳥取県食肉衛生検査所  
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
西村	肇	宮城県食肉衛生検査所
仁平	美咲	沖縄県中央食肉衛生検査所
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
藤田	雅弘	群馬県食肉衛生検査所
牧野	壮一	京都聖母女学院短期大学
水谷	恵子	鳥取県食肉衛生検査所
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
山本	詩織	国立医薬品食品衛生研究所
山本	隆宏	静岡県西部食肉衛生検査所
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
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
渡辺	友子	宮崎都濃食肉衛生検査所

(敬称略、五十音順)

## I. 総合研究報告

平成24-26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  
総合研究報告書

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24-26年度の研究実施により、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検討を、農場・食鳥処理・流通の各段階で行った。農場段階では、東北・九州地方の農場の協力を得て、農場内水平伝播様式及び汚染源の推定に関する研究、持続的汚染を顕す農場での汚染実態調査等を行った。東北地方の農場を対象とした汚染実態調査では、対象鶏舎の出荷鶏群は概ねカンピロバクター汚染を受けており、多くが水平伝播によると推察された。経時的汚染動態に関する検討を通じて、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に、分離調査と分離株の遺伝子型別を行い、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検討では、汚染・非汚染鶏群の処理順序を考慮した場合の交叉汚染発生に関する実証試験を行い、識別と順序替えが可能な場合には、交差汚染を制御する有効な手立てであることが示された。鶏群の汚染をはかる手法としてイムノクロマト法に関する検討を行ったが、現行のキットでは、増菌培養が必要であることが明らかとなった。この他、最終年度にはエアチラー導入施設への立ち入り調査を行い、意見交換を行った。流通段階における検討としては、市販流通食肉におけるカンピロバクター分離陽性率に関する検討を行った他、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。また、文献調査により当該段階での応用可能な手法として報告のあったものを調査し、その中より冷凍処理法に着目した上で、添加回収試験を通じた有効性の評価を行った。当該処理による汚染低減効果は概ね1~2対数個であり、40%の自然汚染率を示す鶏肉挽肉検体を用いた調査では、1日冷凍で陽性率は半減、1週間冷凍で更に半減する等、その有効性が示された。

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、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、処理中の交叉汚染が想定され、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。現行マニュアルの問題点に関する意見を集約した上で、項目別に追加・削除・修正すべき要点を議論し、敗血症に係る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  
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  
大畑 克彦 静岡県西部食肉衛生検査所  
岡野 純 宮城県食肉衛生検査所  
梶川 典子 神奈川県食肉衛生検査所  
梶田 弘子 岩手県食肉衛生検査所  
川久 通隆 兵庫県食肉衛生検査センター  
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  
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  
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  
下村 高司 宮崎都濃食肉衛生検査所  
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  
谷 泉乃 鳥取県食肉衛生検査所  
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  
西村 肇 宮城県食肉衛生検査所  
仁平 美咲 沖縄県中央食肉衛生検査所  
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  
藤田 雅弘 群馬県食肉衛生検査所  
水谷 恵子 鳥取県食肉衛生検査所  
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  
山本 詩織 国立医薬品食品衛生研究所  
山本 隆宏 静岡県西部食肉衛生検査所  
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  
渡辺 邦雄 共立製菓(株)  
渡辺 茂樹 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

## 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





### 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 カンピロバクターに供した。判定は、製品の添付指示書に従った。

#### 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

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。

#### 5) 菌叢解析

分離培養に供した懸濁液より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 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 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 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) カンピロバクター感染とブロイラー日齢の関係

2012年8月から2013年5月に鹿児島県内2カ所のブロイラー飼育農場で得られた各日齢から5検体の直腸スワブを採取し日齢の異なる32鶏群(各日齢から5検体)由来160個体の糞便シードスワブを使用した。カンピロバクターの分離にはmCCDA培地を使用した。集落の純培養にはムーラーヒントン培地を使用し、それぞれ42°C、48時間、微好気培養した。同定には質量分析装置(MALDI-TOF MS)とPCR法を用いた。

#### 2) ブロイラー飼育農場におけるカンピロバクター汚染源

2013年2~3月、7~9月に月2回(約14日間隔)、ブロイラー飼育農場の1~4号舎で得られた材料を検査した。スワブサンプルである斃死雛の遺残卵黄プール、鶏舎入場前長靴底面、堆積糞、盲腸便複数個所プールはmCCDA培地に直接塗布した。原水、貯水槽、鶏舎の手前、中央、奥に設置された飲用水はそれぞれ5mlずつ2倍濃厚プレストン液体培地5mlに接種した。飼料は10gを2倍濃厚プレストン液体培地90mlに接種した。鶏舎周囲の野鳥の糞、サービスルームのネズミの糞は滅菌綿棒でふき取り、2倍濃厚プレストン液体培地5mlに接種した。その後、増菌した2倍濃厚プレストン液体培養液1白金耳量をmCCDA培地に画線塗布した。mCCDA培地上の定型集落を1つ選び、Mueller Hinton (MH) 寒天培地に画線塗布し、純培養した。菌の培養はいずれも微好気条件下で42°C、48時間で行い、同定にはMALDI TOF-MSとPCRを用いた。遺伝子型別には7種類(*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*)の必須遺伝子領域のシーケンスによるMLST (Multilocus sequence typing) 法を用いた。

#### 3) 飼育ブロイラーでの持続汚染要因

材料菌株として、食鳥処理場で採取された鶏盲腸由来*Campylobacter jejuni* 30株を使用した。菌株は農場Aと農場Bから選抜した。農場A由来菌株は2008年9月から2012年7月に5鶏群から計15株(1鶏群3株)を選抜し、農場B由来菌株は2011年4月から2012年9月に5鶏群から計15株(1鶏群3株)を選抜した。菌株は20%グリセロール存在

下で-80℃冷凍保存されており、使用時には保存バイアル 300μl を融解後、M. H. 寒天培地にコンラージを用いて塗布し、微好気条件下で 42℃、48 時間培養後、菌の発育を確認し、MALDI TOF-MS にて *C. jejuni* であることを確認し、DNA を抽出した。その後、M. H. 寒天培地上のコロニーをマイクロバンク（イワキ株式会社）にて-70℃冷凍保存した。菌株の遺伝子型別には MLST に加え、鞭毛構成蛋白をコードするフラジェリン遺伝子の RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) を用いた。

## 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

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血清型、PCR-RFLP 法による遺伝子型

搬入鶏の盲腸便と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 ブイヨンで42℃、24時間、微好気培養後、Butzler agar および mCCDA 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、3,000rpm 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(ビオメリユー)により同定した。また、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 および *Hinf* I で切断し、切断パターンを観察した。

### 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 日目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。

#### 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 を用いた平板希釈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 増菌培地を用いて微好気的条件下で、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 Butzler agar 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でスクリーニング

し、PCRによる菌種同定を行った。

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)、Singlepath Direct Campylobacter poultry Kit GLISA (Merk) 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）の4種を使用した。

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。

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

2011年5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から表1の検体を購入し、カンピロバクターの分離を試みた。なお、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±1℃、25±1時間、微好気条件下で増菌培養後、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、PCR法を用いて菌種の同定を行った。

平成26年度に購入した検体（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、鶏皮2検体、心臓&肝臓1検体、心臓を1検体）はカンピロバクターとともに、一般生菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数の測定を実施した。検体25gを225mlの滅菌PBSに加え30秒間ストマッカー処理を実施した。その後、スパイラルプレーターを用いて、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50μl塗抹した。標準寒天培地およびVRBG培地は35±1℃、24±2時間、XMG培地は35±1℃、48±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を用いて菌数を算出した。

2) 凍結処理に関する検討

①文献検索

2012年5月-7月の間に、PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)を用いて文献検索を行った。該当する文献より要旨内容から関連性の高い文献のみ抽出した。

②供試菌株及び培地

*Campylobacter jejuni* NCTC11168株及び81-176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。培養はMueller-Hinton寒天培地(MHA)又はMueller-Hinton broth (MHB)を用い、微好気条件下で実施した。

③添加回収試験

25gの国産生鶏挽肉を検体として、滅菌ストマッカー袋に分取した。MHA上で一夜培養したNCTC11168株及び81-176株を、検体1gあたり約10<sup>7</sup>個もしくは10<sup>3</sup>個となるよう接種し、-20℃下で冷凍凍結を行った。冷凍処理前および処理後1、2、5、7、14日目に各検体(N=3)を取り出し、生存菌数を求めた。菌数測定に際して、約10<sup>7</sup>個/g接種群については、225mlのPreston培地を用いた懸濁溶液を作成し、同段階希釈液をカナマイシン(30μg/ml)を含むmCCDA培地に塗布し、発育コロニー数より生存菌数を求めた。約10<sup>3</sup>個/g接種検体については、225mlのPreston培地に懸濁した後、MPN法に基づき、算定した。

#### ④EMA-PCR法

検体を対象として、Viable *Campylobacter* Selection kit for PCR および LED Crosslinker 12 (タカラバイオ) を用いて、エチジウムモノアザイド (EMA) 染色を行った。非染色検体を併せて調整後、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。

#### ⑤市販流通鶏挽肉に対する冷凍処理

東京都内で、100-200g/パックとして販売されていた国産生鶏挽肉計 50 検体を購入した。当該検体はラボへ冷蔵輸送後、速やかに 3 検体・25g として滅菌ストッカー袋へ分取した。このうち、1 検体については速やかに NIHSJ-02 法に基づく定性培養試験へ供した。残りの 2 検体 (計 100 検体) は -20°C にて冷凍処理を行い、1 日および 1 週間経過後に、各 50 検体を同上の試験に供した。陽性・陰性の判定は、疑わしい発育集落に対して、Cycleave PCR *Campylobacter* (*jejuni/ coli*) Typing kit (タカラバイオ) を用いた遺伝子検出および DrySpot (Oxoid) を用いた免疫凝集反応により行った。

#### ⑥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。

#### ⑦市販鶏肉における汚染率調査

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°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7-8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度以下で実験室まで輸送搬入し、試験に供した。

検体に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、懸濁試料とした。同懸濁試料のうち、1 mLをPCR定量試験用検体に、さらに1 mLを菌体保存用として採取後、残試料を10 mLにメスアップし、5%馬脱繊維血液、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を添加して、42°Cで微好気培養を行った。増菌培養後、一白金耳量をmCCDA寒天培地に画線塗抹し、42°Cで48時間微好気培養した。典型集落を釣菌し、継代培養し、PCR法による菌種同定を行った。*C. jejuni*或は*C. coli*として同定された菌株については保存を行った。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。

#### ⑧PCR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DNA抽出を行い、Cycleave PCR *Campylobacter* (*jejuni/ coli*) Typing kit (タカラバイオ) を用いたリアルタイムPCR反応を通じて、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、内臓処理後の第一胃～4胃、小腸および大腸について1gあたりの生菌数および大腸菌群数を調査した。また、平成26年度には、第二胃、第三胃、小腸および大腸における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0157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 $25\text{cm}^2$ (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0157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  $\mu$ lをVRBGおよびクロモアガー0157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

食肉検査マニュアル改訂のために疾病の優先順位をつけるために全国7ブロックの食肉衛生検査所にアンケート調査を行った。

全国食肉衛生検査所協議会では豚の非定型抗酸

菌症を診断の標準化対象としていることから、優先順位の1位を豚の非定型抗酸菌とし、牛白血病、豚赤痢、豚丹毒(関節炎型)、萎縮性鼻炎、ヨーネ病について順位付けを行った。

また、食肉検査マニュアルのあるべき姿について検討した。

## 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農場におけるカンピロバクターの鶏舎間伝播様式と汚染源推定に関する研究

##### 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カ所の協力を得て、当該施設内の計98鶏舎より、各1～3検体の盲腸内容を採取し(計242検体)、*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。

以上より、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しうる知見は得られず、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型については新規性のものであった。

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) 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)、*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、B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。昨年度分離できた*C. coli*は分離できなかった。E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。

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。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有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。

#### 6) 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を明らかにし、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。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。4 週齢、5 週齢時において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、4-6 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。

#### 7) 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。

#### 8) 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、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。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。

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)カンピロバクター感染とブロイラー日齢の関係

3日齢から50日齢まで各5羽ずつ検査した結果、カンピロバクターは3日齢から28日齢まで全く分離されず、31日齢から陽性に転じた。

### 2)ブロイラー農場でのカンピロバクター汚染源

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。

### 3)飼育ブロイラー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型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

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、ウィ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血清型、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血清型、PCR-RFLPを行ったところ、血清型はB、C、F、J、L、Yの6血清型に、PCR-RFLPでは*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。

搬入ロ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血清型、PCR-RFLP型を表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、血清型、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血清型、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) 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。

### 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。

## 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牛肉(牛ひき肉50検体、牛スライス肉20検体)、豚肉(豚ひき肉17検体、豚スライス肉22検体)からは検出されなかった。カンピロバクターは22%(6/27検体)の鶏ひき肉、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)の鶏ササミ肉から分離された。平成26年度は、鶏肉に絞って部位別の比較を行ったところ、11%(1/9検体)の鶏モモ肉、13%(1/8検体)の鶏ムネ肉、27%(3/11検体)の鶏ササミ肉、50%の鶏コマギレ肉(1/2検体)、100%の鶏心臓(1/1検体)から本菌が分離された。

H26年度に実施し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。これらの菌数の差は認められなかった。

### 2) カンピロバクター汚染低減に関する情報収集

本研究では、まず海外を中心とした流通段階での制御法に関する情報を収集するため、文献検索を行った。冷凍処理を用いた対策は、既にアイスランド・デンマーク・ニュージーランドの3カ国で実施されており、いずれも当該手法の有効性が検証され

ていた。また、その施策にあたっては、業界による自主的な制度化が糸口となっていた。そのほかに有効性が挙げられた手法としては、有機酸・バクテリオファージ・放射線等が含まれていた。このうち、有機酸については、実用性はあるが、流通・消費過程における制御が困難であることが問題点として挙げられた。また、ファージを用いた食品中の微生物制御は、これまでも腸管出血性 O157 やリステリア等で報告されている他、米国 FDA の認可を受け、製品化もされているが、カンピロバクターに対する同製品の開発には未だ至っていない。放射線殺菌については、社会的に受け入れられ難い情勢であることに加え、経済性の面で劣っていること等が問題点として挙げられた。

以上より、鶏肉におけるカンピロバクター制御に有効かつ実用的な流通段階の手法としては、冷凍処理が最も可能性の高いものとして挙げられた。

### 3) 冷凍処理を通じた国内流通鶏挽肉における *C. jejuni* の生存挙動

国内で生産・流通する鶏挽肉を用いて、冷凍処理を通じた *C. jejuni* の食品内挙動を経時的に観察した。本菌は食品内に潜むストレス因子に応じて複雑なストレス応答をとることが知られており、その定量にあたっては、直接塗抹法が最確数法 (MPN 法) に比べて優位性が高いとされる。

直接塗抹法を用いた検討により、検体 1g あたり約  $10^7$  個となるよう接種した *C. jejuni* NCTC11168 株及び 81-176 株は、1 週間の冷凍処理により、それぞれ  $1.2 \times 10^6$  および  $1.9 \times 10^6$  CFU/g、2 週間後には  $8.2 \times 10^5$  および  $1.1 \times 10^6$  CFU/g へと低減が認められる等、接種菌の食品内生存性は、初期に比較的速やかな、その後は緩やかな低減を示した。

これまでに集積された、市販鶏肉におけるカンピロバクター汚染状況を鑑みれば、しかしながら、上記接種菌数は過剰であることは否めない。そこで、より現実的な食品内汚染菌数を想定して、検体 1g あたり約  $1.8 \times 10^3$  CFU/g となるよう接種し、接種菌の食品内挙動を MPN 法により検討した。結果として、1 週間の冷凍処理により接種菌は、98-145CFU/g、

2 週間の冷凍処理により、10-24CFU/g へと生存性を低減させた。

以上より、鶏肉中のカンピロバクター汚染に対し、冷凍処理は、少なくとも 1 オーダー程度の低減効果を示すことが明らかとなった。

### 4) 市販流通鶏肉の冷凍処理を通じた汚染低減効果の検証

冷凍処理に伴う本菌の鶏肉内生存性低減に係る更なる検討を行うため、市販流通鶏挽肉を用いて、自然汚染検体の数的変動を観察した。入手した検体 (n=50) は、速やかに定性試験に供し、20 検体 (40%) は陽性であることを確認した。並行して、同一検体を冷凍処理 (1 日・1 週間) に供し、その後、同様に定性試験を行い、陽性検体数を求めたところ、1 日の冷凍処理を経た検体では、12 検体 (24%)、1 週間の冷凍処理を経た検体では、6 検体 (12%) が陽性を示した。

以上より、冷凍処理は、自然汚染検体に対しても、本菌の生存性低減に有効性を示すことが明らかとなった。

### 5) 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

NCTC11168 及び 81-176 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 NCTC11168 株では 19.1%、81-176 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 NCTC11168 株の生存率・培養率は、37.6% および 31.3% であり、81-176 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 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。

6) *C. jejuni* 菌株間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、 $2.0E+06 \pm 1.0E+06$  CFU/g、冷凍 7 日後の平均生存菌数は、 $9.8E+05 \pm 5.7E+05$  CFU/g 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。

#### 7) 輸入冷凍鶏肉及び国産冷蔵鶏肉におけるカンピロバクター汚染実態比較調査

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。定量 PCR アッセイにおいて、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それ以下と推察された。

以上の成績は、輸入冷凍鶏肉におけるカンピロバクター汚染率が国産冷蔵鶏肉に比べて明らかに低い値であることを示しており、その差異に関連する因子として、冷凍処理が介在している可能性が十分に考えられた。

### 4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

#### ①牛内臓肉の衛生管理に関する研究

##### 平成 24 年度

小腸、大腸ともに生菌数は  $10^3$  から  $10^6$  の範囲であった。内臓処理施設により菌数に  $10^3$  程度の差があった。

##### 平成 25 年度

小腸、大腸ともに生菌数は最終洗浄と前後において 1log 程度の減少が認められた。

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。

##### 平成 26 年度

内臓処理施設により粘膜面が漿膜面より菌数で 1log 程度多い傾向があった。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。

### ②牛内臓肉の洗浄および加熱処理に関する研究

#### 1) 牛タン表面の洗浄方法に関する検討

無処理対照群を 100%とした場合の、水道水処理群での接種菌汚染菌数は 1 回洗浄後に約 71%、5 回洗浄後には約 52%となった。一方、次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (100ppm) 洗浄群では、1 回洗浄後では約 85%であったが、2 回洗浄後には約 33%、5 回洗浄後では約 9%にまで低減した。これに比べて、微酸性電解水洗浄群では、一回洗浄後に約 24%にまで低減を示す等、より速やかな殺菌効果が認められた。一般細菌数及び腸内細菌科菌群の低減効果についても同様の傾向を認めた。

#### 2) 牛ミノにおける煮沸加熱条件に関する検討

牛ミノ検体を煮沸加熱した場合の一般細菌数および腸内細菌科菌群数は、加熱 10 秒で、未加熱群に比べて有意な減少を示したが、30 秒及び 60 秒煮沸群では、更なる低減を示した。加熱中の湯温は著しい変動を認めなかった。それぞれの指標菌に対する D 値は一般細菌に対しては、59.7 秒、腸内細菌科菌群に対しては 32.3 秒となった。

### 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

アンケート調査の結果、2 位は牛白血病、以下、豚丹毒、豚赤痢、ヨーネ病、萎縮性鼻炎の順に改訂が必要との結果となった。

その他の疾病としては、高度の水腫、中皮腫などが複数のブロックから提案された。

食肉検査マニュアルの問題点として、1. 必要と