

表4 農場Bにおける *C. jejuni* の MLST 型別と RFLP 型の 1 年間の推移

分離日	必須遺伝子							ST	CC	RFLP 型	株数
	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkt</i>	<i>unca</i>				
2011年 4月5日	8	17	2	2	11	59	6	5265	354	G	3
2011年 6月21日	24	17	12	2	2	3	1	4389	464	H	3
2012年 1月24日	8	10	2	2	11	12	6	354	354	A	3
2012年 7月3日	8	10	2	2	11	12	6	354	354	A	1
	24	17	2	15	23	3	12	443	443	D	2
2012年 9月11日	8	10	2	2	11	12	6	354	354	A	1
	2	2	2	2	11	3	1	7012	464	I	2

表5 ブロイラーから分離された *C. jejuni* の詳細

ST	CC	N ¹⁾ /IN ²⁾	分離源	国
354	354	8/352	鶏、人、七面鳥、羊、 子牛、環境水	日本、イギリス、スイス、オーストラリア、 カナダ、ドイツ、オランダ、ベルギー、タイ、アメ リカ、ルクセンブルク、スペイン
6849	354	3/3	鶏	日本
806	21	3/44	牛、人、羊、農場	日本、イギリス、カナダ、アメリカ
443	443	5/30	鶏、人、七面鳥	イギリス、チェコ、オランダ、ギリシャ、 ベルギー、ドイツ、カナダ、ウルグアイ
5721	354	2/3	鶏	日本
824	257	1/61	鶏、人、七面鳥	スイス、イギリス、オランダ、スペイン、 ドイツ、ギリシャ、ルクセンブルク
5265	354	3/5	鶏	日本
4389	464	3/8	鶏、牛	日本
7012	464	2/2	鶏	日本

1) 本研究で分離された株数

2) MLST データベースに登録されている株数

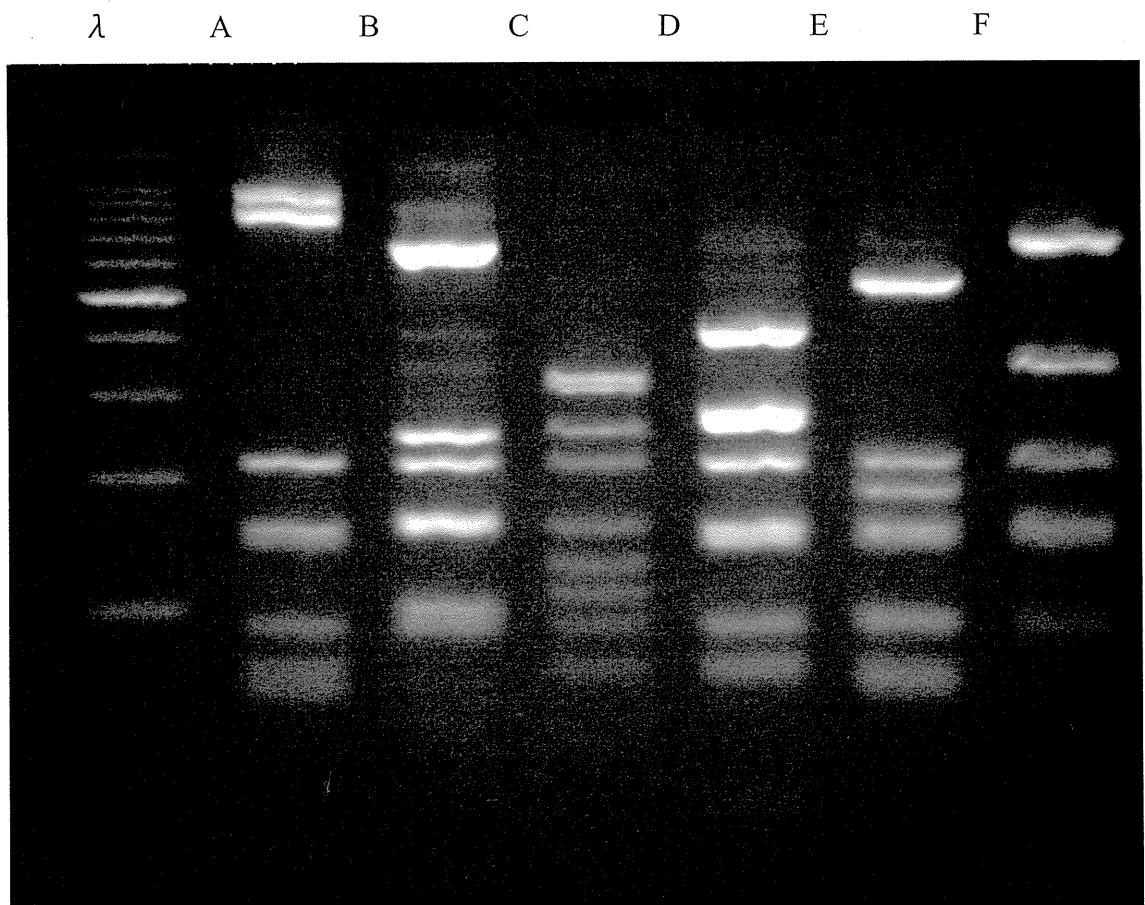


図2 農場 A における *C. jejuni* の *Dde* I 切断による代表 RFLP パターン
 レーン λ : 100bp ラダー、レーン A : ST-354、レーン B : ST-6849、レーン C : ST-806
 レーン D : ST-443、レーン E : ST-5721、レーン F : ST-824

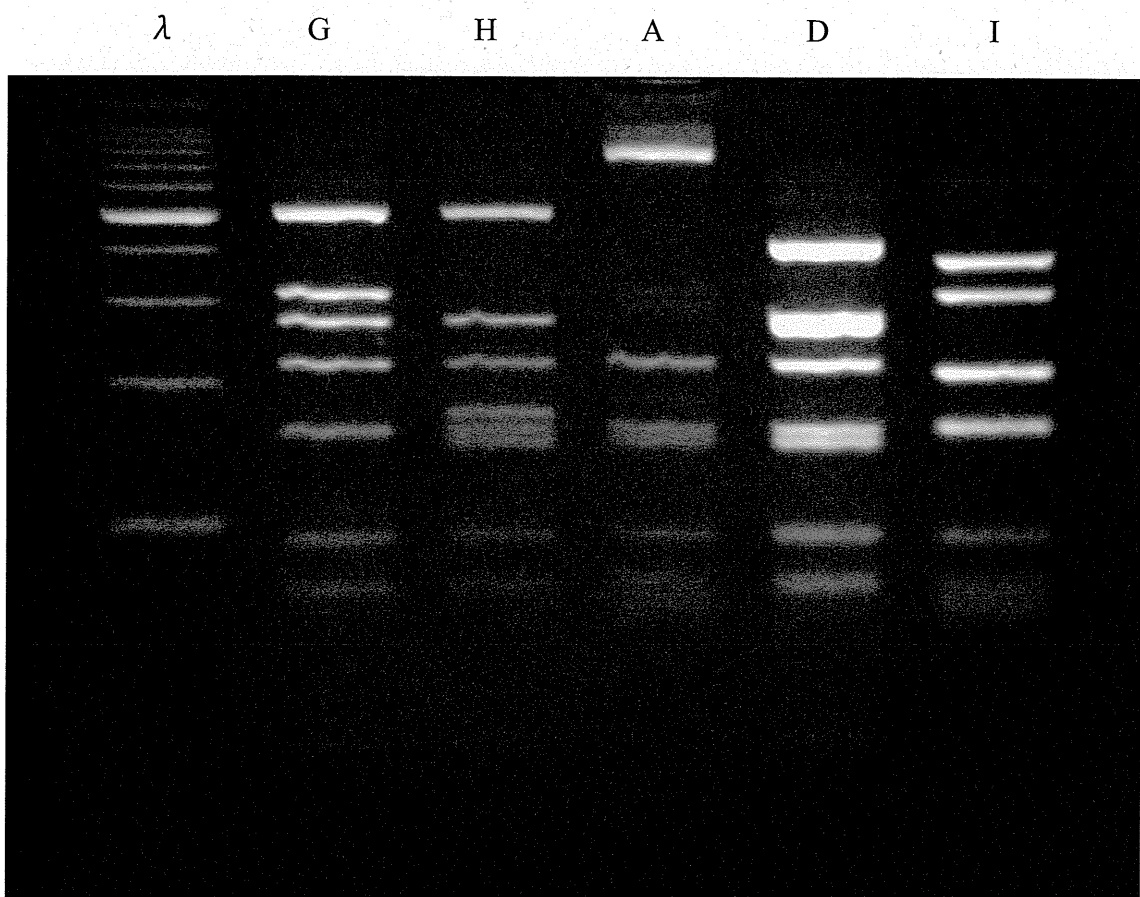


図3 農場 B における *C. jejuni* の *Dde* I 切断による代表 RFLP パターン
 レーン λ : 100bp ラダー、レーン G: ST-5265、レーン H: ST-4389、レーン A: ST-354
 レーン D: ST-443、レーン I: ST-7012

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

分担研究項目:食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御

研究協力者 藤田雅弘 遠藤健太郎 水谷昌代 北川詠子 坂野智恵子 塩野雅孝 渡 昭博
杉本治義 小倉洋裕 松田錦弥 小畑 敏 後藤重幸 星野富男

古茂田恵美子 重村泰毅

鈴木智之

石岡大成 木村博一

分担研究者 森田幸雄

群馬県食肉衛生検査所

東京家政大学

滋賀県衛生科学センター

国立感染症研究所

東京家政大学

研究要旨

市販鶏肉等についてカンピロバクター検査を実施した。カンピロバクターは22%(6/27 検体)の鶏ひき肉から分離され、牛ひき肉(50 検体)、豚ひき肉(17 検体)から分離されなかった(H24 年度)。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、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(H25 年度)。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)から分離され、鶏皮および鶏心臓&肝臓からは分離されなかった(H26 年度)。分離菌は全て *C. jejuni* であり、鶏肉等は *C. jejuni* 食中毒の感染源となりうる事が再確認された。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と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血清型や PCR-RFLP 遺伝子型によって判明した。食鳥と体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°C および -80°C 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。区分処理の可能性を考え、処理場に搬入される前に、鶏群のカンピロバクター汚染を把握するための迅速簡便な検査方法について検討した。処理場に搬入される鶏群の糞便中でのカンピロバクター菌数は搬入の14日前から処理当日までほとんど変わらないことが判明した。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が、菌数が 10^6 個/g でなければ検出されないことがあり、増菌培養が必要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を行っているが、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。

A. 研究目的

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。特に鶏肉や汚染された食品の喫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。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* であることから食品衛生上の重要な細菌である。

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。

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。

そこで、平成24年度調査ではA食鳥処理場でのカンピロバクター汚染調査を実施し、分離 *C. jejuni* の血清型を、平成25年度では分離 *C. jejuni* のPCR-RFLP法による遺伝子型を実施し、食鳥処理場内での汚染の状況を把握した。また、農場段階でのカンピロバクター制御として、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のかの解明を試みた。さら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。また、冷凍処理によるカンピロバクターの減少効果を実施した。

B. 研究方法

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、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 25 ± 1 時間、微好気条件下(80% N_2 、10% CO_2 、5% O_2 、5% H_2)で増菌培養後、Butzler agar および m CCDA 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 μl 塗抹した。標準寒天培地およびVRBG培地は $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 24 ± 2 時間、XMG培地は $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 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(aCOLyte: Symbiosis 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. 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(Oxoid)で 42°C, 24 時間, 微好気培養後, Butzler agar(Oxoid)および mCCDA(Oxoid)を用いて 42°C, 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(ピオメリユ)により同定した。また, klena らの方法に従い 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(25cm² × 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°C, 24 時間, 微好気培養後, mCCDA, Butzler agar に塗抹し 42°C, 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(Roch)および *Hinf* I(Roch)で切断し, 切断パターンを観察した。

3. 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 8.0×10^7 個/ml の試験菌液を 1ml 接種し, 10 倍量の Preston ブイヨンに加え, 4°C, -20°C, -80°C 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。

4. 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、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) を用いて微好氣的条件下で、42°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 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 × 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。

C. 研究結果

1. 市販鶏肉のカンピロバクター汚染調査(表

1)

カンピロバクターは今回供試した牛肉(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)の鶏ひき肉から分離され、牛ひき肉(50 検体)、豚ひき肉(17 検体)から分離されなかった(H24 年度)。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、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(H25 年度)。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)から分離され、鶏皮および鶏心臓&肝臓からは分離されなかった(H26 年度)。分離菌は全て *C. jejuni* であり、鶏肉等は *C. jejuni* 食中毒の感染源となりうる事が再確認された。

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 5.5×10^5 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。これらの菌数の差は認められなかった。

2. 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: $P=0.03$)

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。

3. 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 8.0×10^7 個/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 4.0×10^6 cfu/ml), 4°C, -20°C, -80°C 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°C で保持した場合, 2 時間後は 2.6×10^6 個/ml, 24 時間後は 2.8×10^6 個/ml, 48 時間後は 7.4×10^6 個/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°C で保持した場合, 2 時間後は 1.9×10^6 個/ml, 24 時間後は 3.3×10^4 個/ml, 48 時間後は 9.3×10^4 個/ml, 鶏肉を -80°C で保持した場合, 2 時間後は 3.2×10^5 個/ml, 24 時間後は 4.5×10^4 個/ml, 48 時間後は 9.0×10^4 個/ml であった。-20°C および -80°C 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。

4. 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 3.7×10^7 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。

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 3.0×10^8 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)。

D. 考察

1. 市販鶏肉のカンピロバクター汚染調査(表1)

カンピロバクターは今回供試した牛肉70検体(牛ひき肉50検体、牛スライス肉20検体)、豚肉39検体(豚ひき肉17検体、豚スライス肉22検体)からは検出されず、鶏肉等からのみの分離されたことから、鶏肉等は牛肉や豚肉に比べて*C. jejuni*による食中毒の感染源となりうることが再確認された。

H26年度調査ではカンピロバクターは20%(6/30検体)の鶏肉から分離された。H25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)の鶏ササミ肉から分離されている。H25年度、H26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、H25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、H26年度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。

カンピロバクターが検出された6検体の鶏肉および検出されなかった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ると思われる。

2. 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。分離株についてまず、血清型別を実施したが、血清型が判明する株が少なかったため、血清型別に続きPCR-RFLP遺伝子型別を実施した。血清型やPCR-RFLP遺伝子型別から、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血清型、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る。

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。

3. 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0個とはならない。ヒトのカンピロバクター感染菌量は 10^2 個以下であることから、鶏肉の生食は避けるべきであると思われた。

4. 農場におけるカンピロバクター汚染調査

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。

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。

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に証明された。鶏肉へのカンピロバクター汚染を無くす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。

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。

現在、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、鶏肉の衛生度が対価として得られていない現状である。このことが、カンピロバクター汚染の無い鶏肉の生産意欲を減少させているのではないかと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表等

なし

2. 学会等発表

北川詠子, 水谷昌代, 塩野雅孝, 藤田雅弘, 清水静一, 松田錦弥, 星野富男. 「食鳥処理場に搬入された鶏のカンピロバクター保菌調査」

日本獣医公衆衛生学会(関東・東京地区), さいたま市(大宮ラフォーレ清水園), 平成24年9月2日

森田幸雄, 古茂田恵美子, Potjanart BOONMA, 石岡大成, 山本茂貴, 野田雅博, 小澤邦壽, 木村博一, 「市販ひき肉中の *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella* 汚染状況」, 日本食品微生物学会, 福岡市(アクロス福岡), 平成24年10月25日

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, 学術奨励賞受賞

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, 地区学会長賞受賞

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, 国立医薬品食品衛生研究所, 平成26年12月12日

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

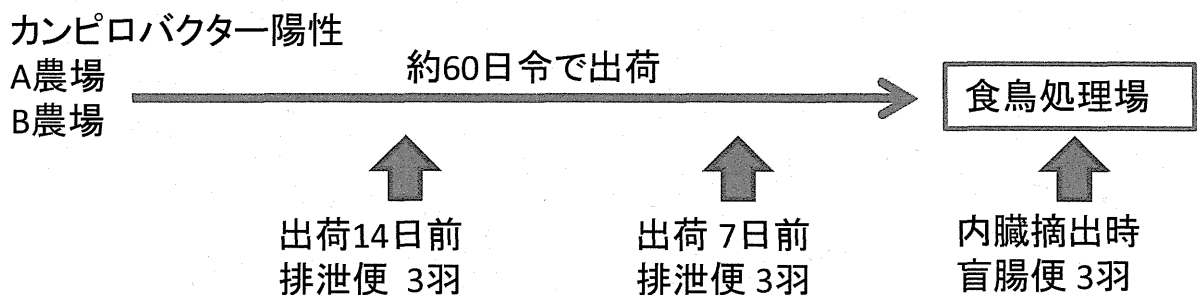
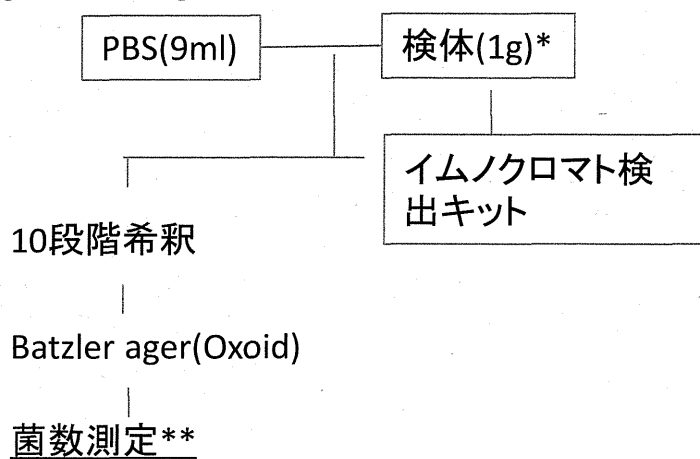


図 1 検体採取方法

[直接法]



* : 検体は冷蔵保持し6時間以内検査に供試

** : 発育集落はグラム染色、LAラテックス凝集試験(デンカ生研)、PCRで菌種同定

[増菌法]

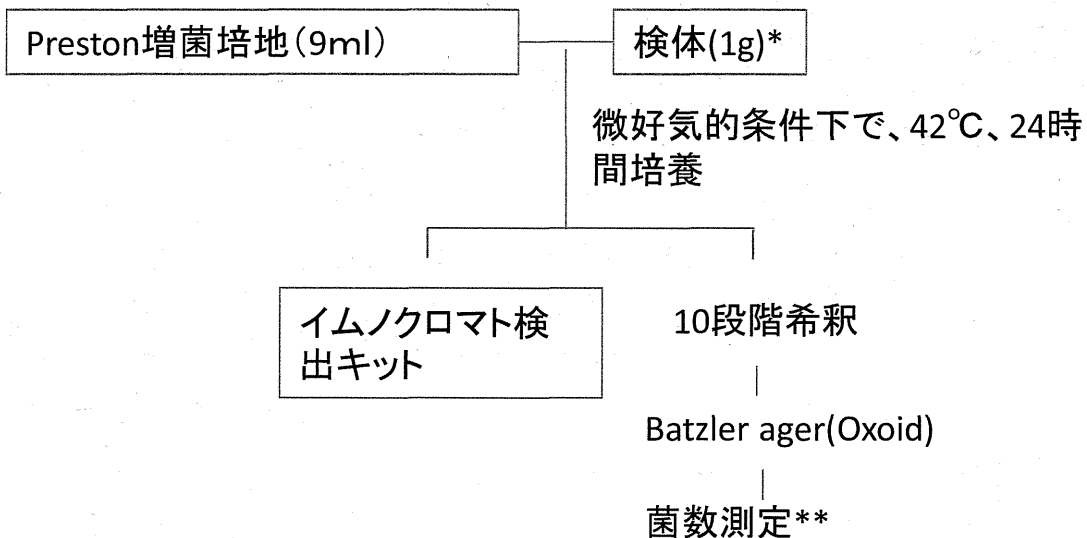


図 2 直接法・増菌法の検査方法

表 1 市販食肉等からのカンピロバクター分離状況

検体名	調査年度	陽性検体数/検体数 (%)
鶏ひき肉	H24	6/27 (22)
鶏モモ肉	H25	11/26 (42)
鶏モモ肉	H26	1/9 (11)
鶏ムネ肉	H25	12/30 (40)
鶏ムネ肉	H26	1/8 (13)
鶏ササミ肉	H25	2/31 (6)
鶏ササミ肉	H26	3/11 (27)
鶏こまぎれ肉	H26	1/2 (50)
鶏心臓	H26	1/1 (100)
鶏皮	H26	0/1 (0)
鶏心臓 & 肝臓	H26	0/1 (0)
牛ひき肉	H24	0/50 (0)
牛スライス肉	H25	0/20 (0)
豚ひき肉	H24	0/17 (0)
豚スライス肉	H25	0/22 (0)

表 2 搬入ロットごとの盲腸便およびふきとり検体からのC.jejuni/C. coli 検出状況と血清型、PCR-RFLP型

実施日	群名	盲腸便			脱羽後とたい			内臓摘出後とたい			チラー通過後とたい		
		検出の有無	血清型等	PCR-RFLP 遺伝子型	検出の有無	血清型等	PCR-RFLP 遺伝子型	検出の有無	血清型等	PCR-RFLP 遺伝子型	検出の有無	血清型等	PCR-RFLP 遺伝子型
5月10日	NGT1	-			-			-			-		
	MGF	-			-			-			-		
	HJO1	+	J, UT	L,H	+	J, F	L	+	J, UT	L	+	J, UT	L
5月14日	TKS	-			-			-			-		
5月24日	OIB	-			-			-			-		
	IST	-			-			-			-		
	MGE	-			-			-			-		
5月31日	KNB1	+	L	O	+	L	O	+	L	O	+	L	O
	ISK	+	B, L, UT	P	+	UT	O,P	+	O,P	B	-		
7月10日	AKG1	+	UT	A	+	F	J	-			-		
	HJO2	+	実施せず	E,F	+	実施せず	E,F	+	実施せず	E,F	-		
	TYC	-			+	A,E	A,E	+	A,E	A,E	-		
7月17日	AKG2	+	B, L, F, UT	G,A	+	UT	A	+	UT	A	-		
	NGT2	-			+	G	G	-			-		
	KGW	+	実施せず	B,E,I	+	実施せず	B,E	+	実施せず	B,E	-		
7月26日	HGW1	-			-			-			-		
	HGW2	+	C. coli	C	+	C. coli	C	+	C. coli	C	+	C. coli	C
	TKT1	+	L, UT	I	+	L	I	+	UT	I	-		
10月16日	HJM1	+	Y, UT	M,R	+	C	M	+	C	M	-		
	HJM2	+	Y, UT	N	+	C	B	+	C	B	-		
	TKT2	+	C, UT	I	+	C	I,O	+	UT	I,O	-		
10月30日	HKD	-			-			-			-		
	NGO	-			-			-			-		
	KNB2	+	実施せず	O	+	実施せず	O	+	実施せず	O	-		

- :カンピロバクターが検出されず

+ :カンピロバクターが検出

冷凍処理による鶏肉中のカンピロバクター汚染制御に関する研究

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	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
協力研究者	倉園 久生	帯広畜産大学	動物・食品検査診断センター
協力研究者	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・ジェジュニ（以下、*C. jejuni*）による食中毒事例は、国内外を問わず最も高い頻度で発生している。疫学情報の集積に伴い、本食中毒の発生には、鶏肉を介する割合が高いと想定される現状を踏まえ、本研究では、鶏肉の流通段階におけるカンピロバクター汚染低減に資する手法について検討を行うこととした。文献検索を通じ、冷凍処理が最も実用性に富み、アイスランド・デンマーク・ニュージーランドの 3 カ国で既に実施されていることを確認した。同処理が国内流通鶏肉でのカンピロバクター汚染低減に果たす効果を評価するため、鶏挽肉への添加回収試験を行い、鶏肉中における *C. jejuni* の消長は、菌株・接種菌数により差異を示すものの、1 週間の冷凍処理後には、1-2 対数個の低減を認めた。また、約 40% の自然汚染を顕す鶏挽肉を検体として同処理を行ったところ、1 日処理後には陽性率は半減した。国産冷蔵鶏肉と輸入冷凍鶏肉（共にモモ肉）における汚染率を定性試験により比較したところ、国産冷蔵鶏肉検体が 26.7%（12 検体/45 検体）の陽性率であったのに対し、輸入冷凍鶏肉では 2.2%（1 検体/45 検体）と顕著な差異が認められた。以上の成績は、国内に流通する鶏肉のカンピロバクター汚染に対し、冷凍処理は低減効果を有することを示しており、流通過程における一手法として応用性を秘めていると考えられた。一方で、これまでの研究結果は、研究機器を用いた検証に留まることから、今後は、実用機器を用いた上で、より短時間での制御効果に関する知見を集積することで、その応用性を判断する科学的根拠の創出をはかりたい。

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ている。本属菌は 1982 年に食中毒細菌に指定された比較的新しい腸管系病原菌であり、これまでに 18 菌種 6 亜種 3 生物型に分類されている。このうち、ヒトの下痢症と最も関連性が高いのは *C. jejuni* 及び *C. coli* である。

厚生労働省・食中毒統計によると、*C. jejuni*・*C. coli* による食中毒は、近年わが国で発生する細菌性食中毒の中で最も発生件数が

多く、その約 9 割は、*C. jejuni*、残りの 1 割は *C. coli* により発生している。また、散发事例の割合が高いのも、本菌による食中毒の特徴の 1 つであり、感染患者では 2-5 日とやや長い潜伏期間を経た後、下痢、腹痛、発熱、悪心、嘔吐、頭痛、倦怠感等の臨床症状を呈する。また、近年では、神経変性症の一種である、ギランバレー症候群 (GBS) との関連性も指摘されており、その感染制御へとつながる食品の衛生管理の充実は、広く公衆衛生の向上をはかる上で、必要不可欠な課題であるといえる。

平成 22 年～23 年の厚生労働科学研究費補助金 (H22-食品-一般-009, H23-食品-一般-010) では、国内におけるカンピロバクター食中毒の原因食品の推定に関する分子疫学的検討を行い、鶏肉がおおよそ 7-8 割のカンピロバクター食中毒の原因となっていることを報告した。これらの成績は、欧米におけるデータともほぼ一致しており、鶏肉における本菌の汚染制御を目指す取り組みが必要であることを示してきた。

わが国の鶏肉消費量を見ると、約 3 分の 1 は輸入品で占められており、平成 24 年度の国別輸入量としては、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 千トンと続く状況にある。一方で、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。物流の国際化が進むにつれ、今後こうした輸入食品はより我が国の流通・消費において重要性を増すと共に、それらの安全性についてもより留意すべきと考えられる。特にカンピロバクター食中毒は、先進国を中心として、世界各国で多発しており、流通する国内外で生産・加工された鶏肉をより包括的に流通段階で制御する手立ての開発や検証は、きわめて重要な課題と考えられる。

以上の背景をもとに、本研究では、鶏肉におけるカンピロバクター汚染制御に資する手法に着目した検討を行うこととした。第一年次には、海外における対策に係る文献検索の探索を通じ、冷凍処理を用いた国内流通鶏肉におけるカンピロバクター汚染低減効果について検討を行うこととした。また、第二年次には、冷凍処理に伴う本菌の生存挙動を培養性と併せて比較・検証し、冷凍処理の菌数低減に対する有効性を精査することとした。最終年次には、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汚染率の比較検証を行うことで、冷凍処理の制御効

果を実態として捉えることとした。

B. 研究方法

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-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。

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 10^7 個もしくは 10^3 個となるよう接種し、 -20°C 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 10^7 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 ($30 \mu\text{g/ml}$) 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 10^3 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。

4. 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 12 (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。

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として滅菌ストマ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℃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。

7. 菌株間の冷凍抵抗性比較試験

MHブ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。

8. 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。

9. 分離培養

検体にニュートリエントブイヨンNo.2(メルクーミリポア)10mLを添加、懸濁試料とした。同懸濁試料のうち、1mLをPCR定量試験用検体に、さらに1mLを菌体保存用として採取後、残試料を10mL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℃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℃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。

10. 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1mL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。

(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. 鶏肉汚染カンピロバクター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。概要をまとめたのが表1である。

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。

そのほかにも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 0157 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が問題点として挙げられた。これらに関わる代表的文献については表2および表3に列挙したので参照されたい。

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。

2. 冷凍処理を通じた国内流通鶏挽肉における *C. jejuni* の生存性挙動

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（食塩、糖、pH、酸等）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-KM 株及び 81-176-KM 株は、1 週間の冷凍処理により、それぞれ 1.2×10^6 および 1.9×10^6 CFU/g、2 週間後には 8.2×10^5 および 1.1×10^6 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、その後は緩慢な低減を示した（図1）。

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 1.8×10^3 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（図2）。

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。

3. 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。