

御効果があると目された(図2および図3)。国内で生産・加工される鶏肉の多くは、チルド帯で同日中に出荷されるため、短時間での同処理は実用性を伴う応用制御策の一つとして、今後検討すべき課題となると考えられる。

急速液体冷凍処理に伴う本菌の生存挙動に関する検討を通じては、鶏肉に由来するドリップ添加が同処理に伴う本菌の生存性低減の抑制に作用しうるとの知見も得られた(図4および図5)。鶏肉由来ドリップには、多種類の蛋白、糖、脂肪酸等が含まれており、カンピロバクターのバイオフィーム形成を促進する作用があるとの報告もある²⁰⁾。本菌におけるバイオフィーム形成は、他の細菌と同様に、多様な環境ストレスに対する耐性機構の一つとして位置づけられており、同形質発現を担うドリップ中成分の同定については、今後の検討課題として考える。

冷凍処理法の適用箇所については、部分肉として出荷から流通にかけてのものが一般的と想定されるが、一方で丸鶏として出荷されるケースも一定数存在する。こうした形態の鶏肉製品に対する適用性を考察するため、本研究では、自然汚染を示す丸鶏を対象として3時間の急速液体冷凍処理による汚染低減効果を検証した。同処理により丸鶏あたり約0.7対数個の生存菌数の低下が認められた(図7)。急速液体冷凍処理では、検体内部まで速やかな温度低下を表すため、本菌の汚染部位を限定的に捉える必要性も少ないと考えられる。そのため、鶏肉の加工形態にとらわれず、一定の汚染低減効果を示すという点は本手法の有用性として評価されるものと思われる。

以上のように、本研究では、カンピロバクター・ジェジュニによる鶏肉汚染を検討対象

として、添加回収試験を通じた、急速液体冷凍処理による本菌生存挙動に関する時系列データの収集を行った。膜安定性挙動評価を通じ、急速液体冷凍処理による本菌の速やかな生存性減少は、損傷状態によるものとも考え難く、確実に生存菌数の低減に資する手法であることが示された(図6)。本研究で検討した急速液体冷凍処理法の実用的な運用には、応用性を担保しつつ、よ

り詳細な条件検討が必要と考えられるが、鶏肉の流通・保存に際して品質の低下を最小限に抑える利点もあり、加工・流通段階における本菌汚染を低減する一手法として今後の応用が期待される。

E. 結論

本研究では、食鳥肉を高頻度に汚染するカンピロバクター低減対策として、流通段階における冷凍手法の応用性について、食鳥肉加工場等での導入実績のある冷凍装置(クラストフリージング)、ならびに馬肉をはじめとする食品の冷凍保蔵に使用実績のある急速液体冷凍装置を用いた際の、本菌汚染低減効果について検討を行い、何れも短時間処理により一定の汚染低減効果を示すことを明らかにした。同効果については、しかしながら、同処理のみにより、本菌の完全な除去を行うことはするには至らないことも明らかにされ、フードチェーン全体を通じた低減対策の組み合わせが重要であるとの結論を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

・朝倉宏、山本詩織、橘理人、吉村昌徳、山本茂貴、五十君静信. 冷凍処理による鶏肉中でのカンピロバクター汚染低減効果に関する検討. 日本食品微生物学会雑誌. 32(3): 159-166.

2. 学会発表

・朝倉宏、野田大樹、吉村昌徳、小西良子、山本茂貴、五十君静信. 冷凍処理による鶏肉中でのカンピロバクター汚染低減効果に関する検討. 第36回日本食品微生物学会学術総会. 平成27年11月. 川崎市.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 引用文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター. カンピロバクター感染症.
http://idsc.nih.gov.jp/idwr/kansen/k05/k05_19/k05_19.html
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課. 食中毒統計資料.
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/04.html
- 3) Batz MB, Hoffmann S, Morris JG Jr. Ranking the disease burden of 14

- pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *J Food Prot.* 75: 1278–1291 (2012).
- 4) Sheppard SK, Dallas JF, Strachan NJ, MacRae M, McCarthy ND, Wilson DJ, Gormley FJ, Falush D, Ogden ID, Maiden MC, Forbes KJ.: *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clin Infect Dis.* 48: 1072–1078 (2009).
 - 5) Asakura H, Brüggemann H, Sheppard SK, Ekawa T, Meyer TF, Yamamoto S, Igimi S.: Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. *PLoS One.* 7: e48394 (2012).
 - 6) 内閣府食品安全委員会. 微生物・ウイルス評価書「鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ」(2009).
<https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluation/Document/show/kya20041216001>
 - 7) Tustin J, Laberge K, Michel P, Reiersen J, Dadadóttir S, Briem H, Hardardóttir H, Kristinsson K, Gunnarsson E, Fridriksdóttir V, Georgsson F. A national epidemic of campylobacteriosis in Iceland, lessons learned. *Zoonoses Public Health.* 58: 440–447 (2011)
 - 8) Wingstrand A, Neimann J, Engberg J, Nielsen EM, Gerner-Smidt P, Wegener HC, Mølbak K.: Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 12: 280–285 (2006).
 - 9) Baker M1, Wilson N, Ikram R, Chambers S, Shoemack P, Cook G.: Regulation of chicken contamination is urgently needed to control New Zealand's serious campylobacteriosis epidemic. *NZ Med J.* 119: U2264 (2006).
 - 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長. 生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について. 平成 23 年 6 月 17 日, 食安発 0617 第 3 号(2011).
http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110617_02.pdf
 - 11) 百瀬愛佳, 五十君静信. カンピロバクター「平成 25 年度食品の食中毒菌汚染実態調査における検査法(NIHSJ-02)」。食品衛生検査指針微生物編. pp. 312–315. 公益社団法人日本食品衛生協会 (2015).
 - 12) Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG.: Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*., *J Clin Microbiol.* 40: 4744–4747 (2002)
 - 13) Bronowski C, James CE, Winstanley C.: Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett.* 356: 8–19. (2014)
 - 14) Kassem II, Chandrashekar K, Rajashekara G. A relationship between viable but non-culturable cells formation and inorganic polyphosphate and formate metabolism in *Campylobacter jejuni*. *Front Microbiol.* 4: 183 (2013)
 - 15) Georgsson F, Thornorkelsson AE, Geirsdóttir M, Reiersen J, Stern NJ. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiol.* 23: 677–683 (2006).
 - 16) Rosenquist H, Sommer HM, Nielsen NL, and Christensen BB.: The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol.* 108: 226–232 (2006).
 - 17) Sandberg M, Hofshagen M, Østensvik Ø, Skjerve E, Innocent G. Survival of *Campylobacter* on frozen broiler carcasses as a function of time. *J Food Prot.* 68: 1600–1605 (2005).
 - 18) 農林水産省生産局畜産部食肉鶏卵課. 食肉鶏卵速報. 平成 27 年 3 月 (2015).
http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/pdf/monthly_h27m3.p
 - 19) 小野一晃, 辻りえ, 安藤陽子, 大塚

佳代子, 柴田 穰ら. 国産および輸入鶏肉におけるカンピロバクターの汚染状況. 日獣会誌. 56: 103-105 (2003).

- 20) Brown HL, Reuter M, Salt LJ, Cross KL, Betts RP, van Vliet AH. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ

Microbiol. 80: 7053-7060. (2014)

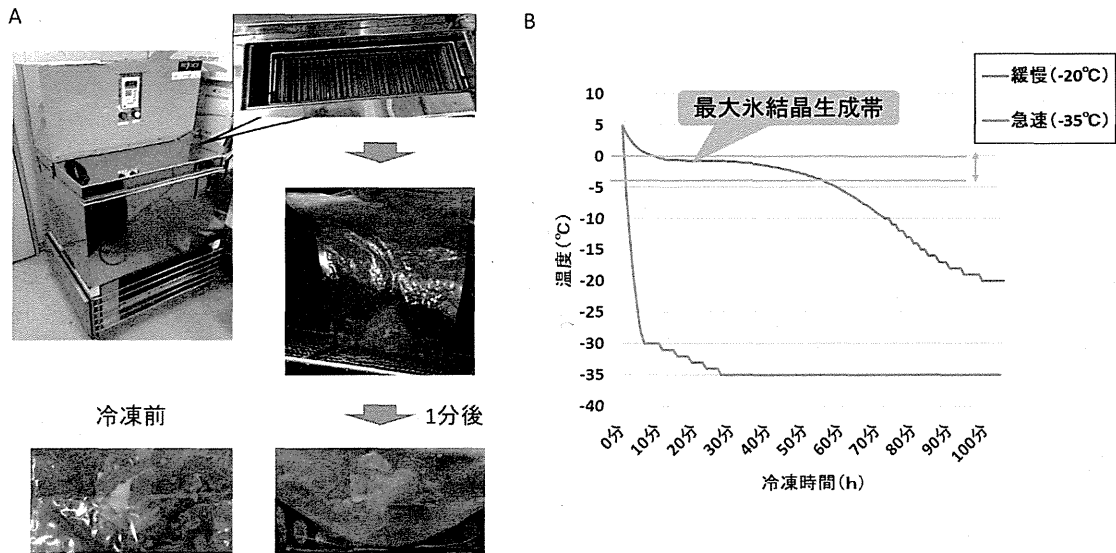


図1. 急速液体冷凍機の外観・ワークフローおよび検体温度変化.
 (A)本研究で使用した急速液体冷凍機の外観およびワークフロー.
 (B)急速液体冷凍および緩慢冷凍における鶏モモ肉 25 g の温度変化の比較図.

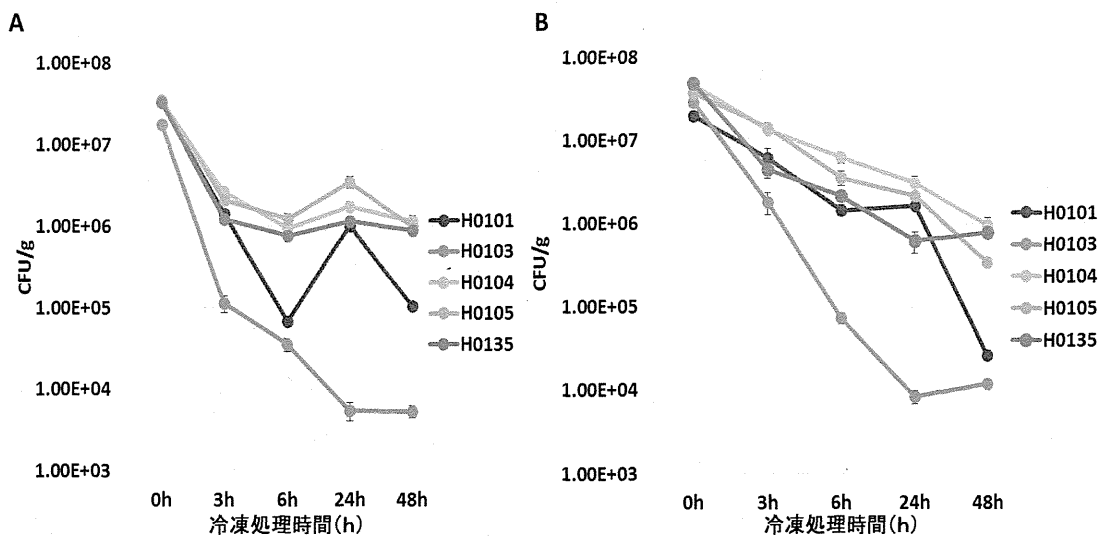


図2. 急速液体冷凍処理 (A) あるいは緩慢冷凍処理 (B) に伴う、鶏モモ肉検体 25 g 中のカンピロバクター・ジェジュニ 5 株の生存挙動.

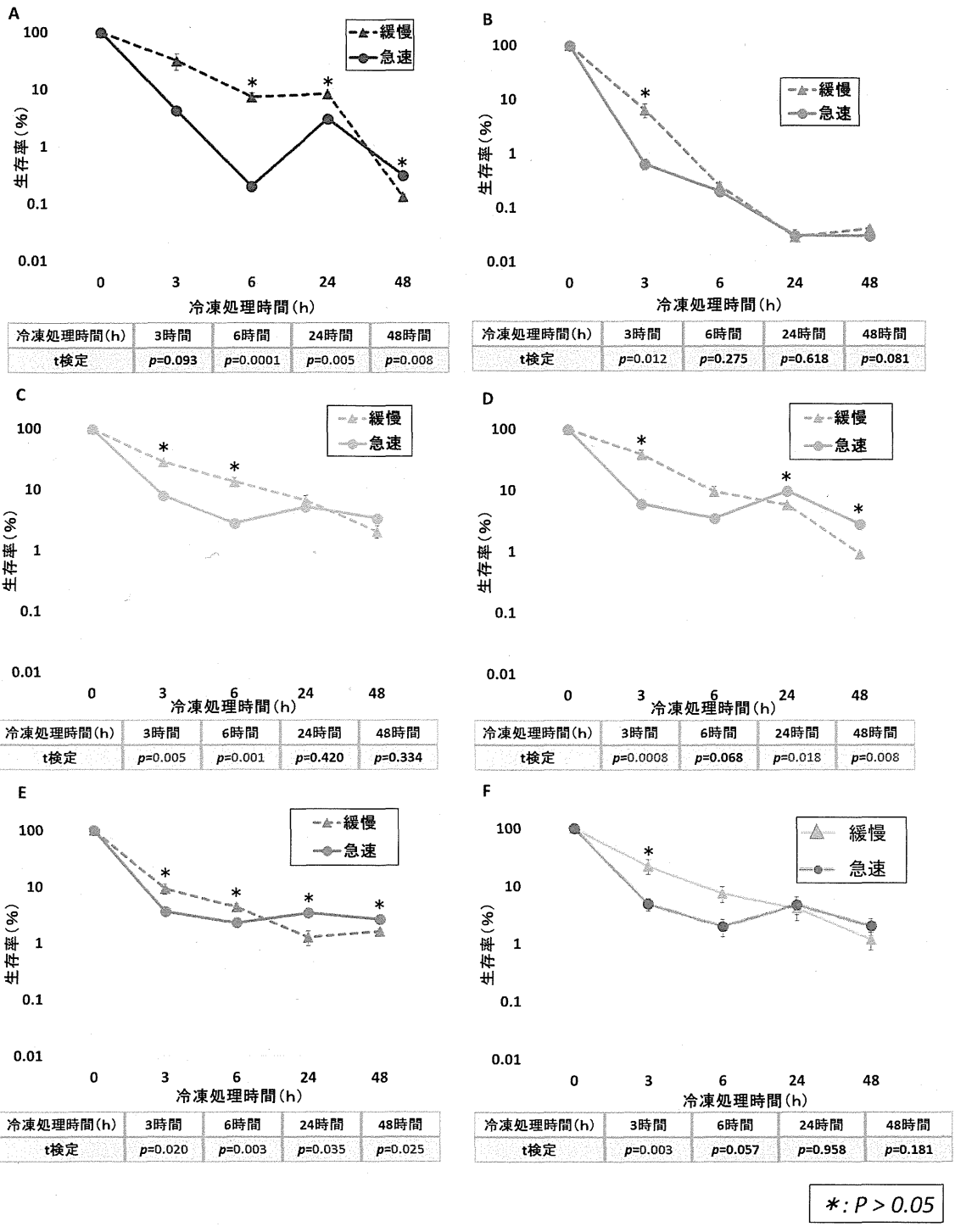


図3. 急速液体冷凍処理および緩慢冷凍処理に伴う、鶏モモ肉中のカンピロバクター・ジェジュニの生存挙動。H0101株(A)、H0103株(B)、H0104株(C)、H0105株(D)、H0135株(E)、および全5株平均(F)に係る生存挙動の比較を示す。なお、各数値は、冷凍処理0日目を生存率100%と仮定したうえで、各検体の生存率を算出している。

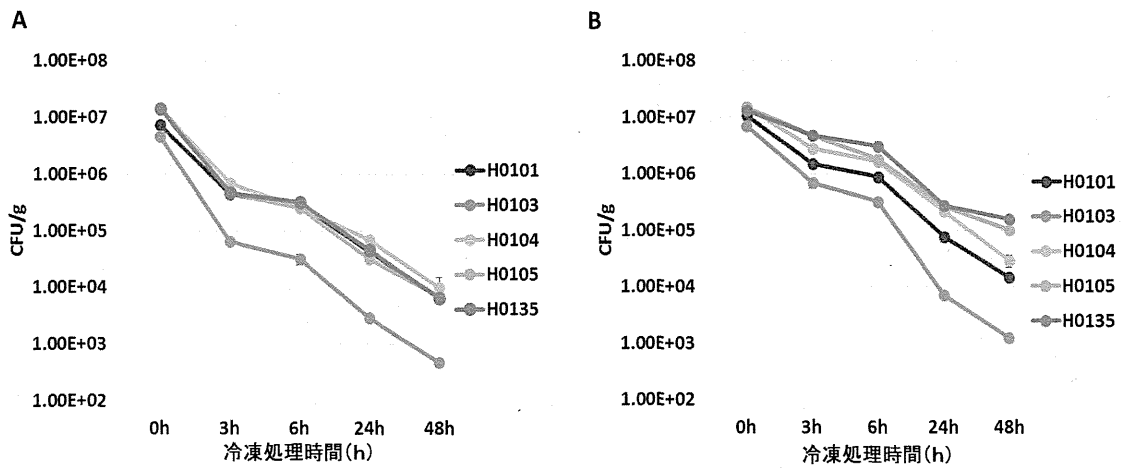
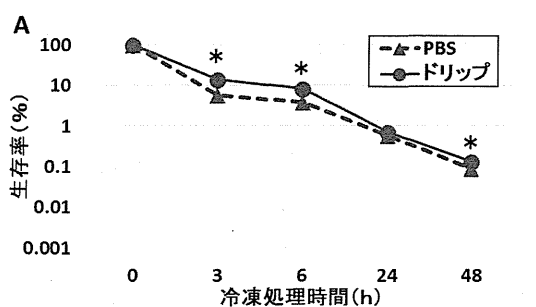
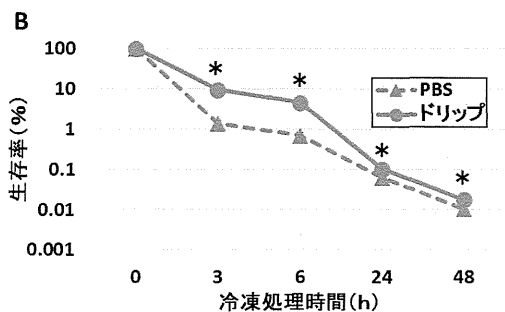


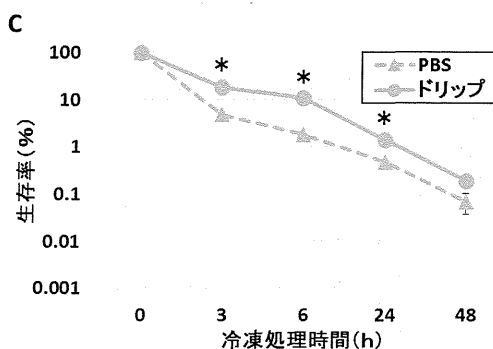
図4. 急速液体冷凍処理に伴う、PBS (A) あるいは10%ドリップ加PBS (B) 中でのカンピロバクター・ジェジュニ 5株の生存挙動。



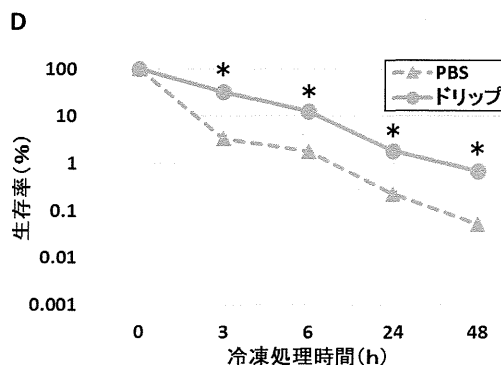
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.0003$	$p=0.00004$	$p=0.2985$	$p=0.0023$



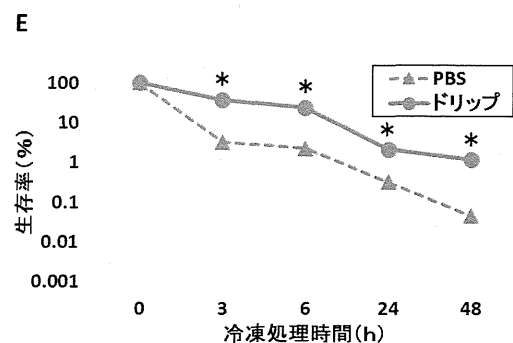
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.0004$	$p=0.0001$	$p=0.0024$	$p=0.0002$



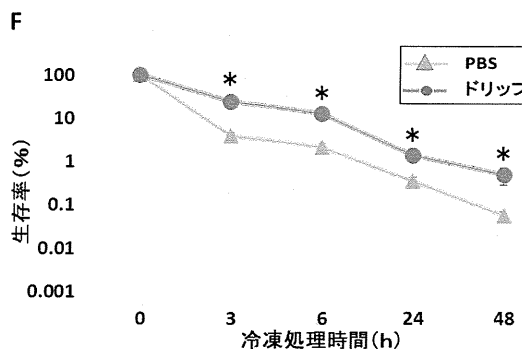
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.00005$	$p=0.00001$	$p=0.00005$	$p=0.062$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.0026$	$p=0.0002$	$p=0.00006$	$p=0.00001$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.00001$	$p=0.002$	$p=0.00001$	$p=0.00001$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.003$	$p=0.002$	$p=0.020$	$p=0.035$

*: $P > 0.05$

図5. 急速液体冷凍処理に伴う、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) あるいは10%ドリップ加PBS (ドリップ) 中でのカンピロバクター・ジェジュニの生存挙動. H0101株 (A)、H0103株 (B)、H0104株 (C)、H0105株 (D)、H0135株 (E)、および5株平均 (F) に係る生存挙動の比較を示す. なお、各数値は冷凍処理0日目を生存率100%と仮定したうえで、各検体の生存率を算出している.

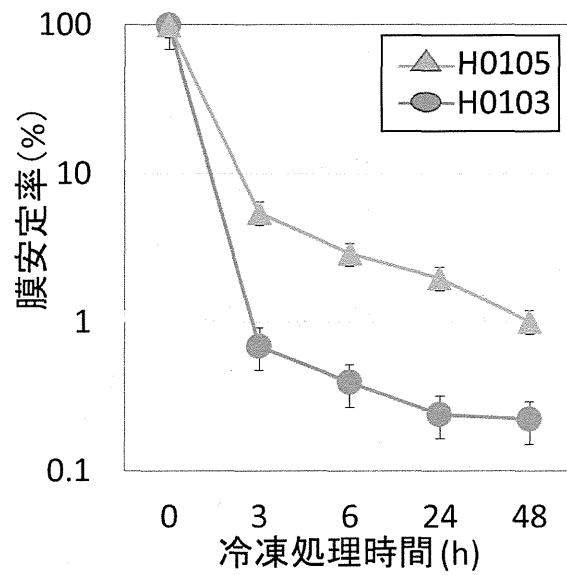


図6. 急速液体冷凍処理に伴う、PBS 中でのカンピロバクター・ジェジュニ代表株 (H0103 および H0105 株) の膜安定性挙動.

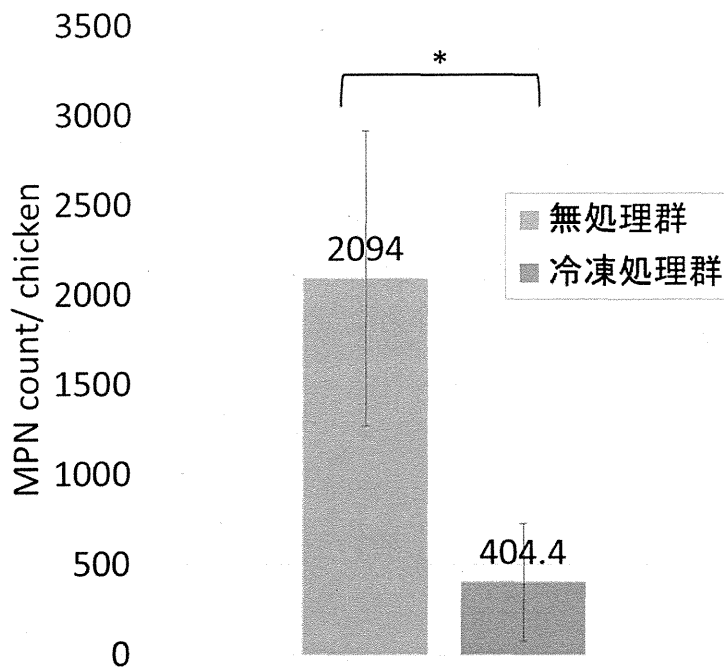


図7. 急速液体冷凍処理 (3h) に伴う、丸鶏自然汚染カンピロバクター菌数の変動.

表1. クラストフリージングによる食鳥部分肉中の自然汚染カンピロバクター低減効果 (A社)

部位	処理 ^{*1}	カンピロバクター	指標菌数 (CFU/g)		
		(MPN count/g)	生菌数	大腸菌群数	腸内細菌科菌群数
モモ	チルド	11.00	6.0.E+04	2.6.E+04	1.8.E+04
	冷凍	11.00	7.8.E+04	2.7.E+04	2.0.E+04
ムネ	チルド	0.68	2.4.E+04	1.0.E+04	9.3.E+03
	冷凍	0.11	7.1.E+03	4.0.E+03	2.4.E+03
ササミ	チルド	0.27	6.0.E+03	6.3.E+02	2.2.E+02
	冷凍	0.19	6.0.E+02	8.3.E+01	1.2.E+02
レバー	チルド	11.00	2.8.E+04	3.2.E+04	2.3.E+04
	冷凍	3.10	2.8.E+03	1.5.E+03	1.7.E+03
砂肝	チルド	11.00	4.6.E+03 ^{*2}	1.8.E+03	1.1.E+03
	冷凍	0.16	5.8.E+02	3.7.E+02	1.2.E+02

A社において生産・加工される種々の食鳥部分肉（同一ロット）を対象として、クラストフリージング処理によるカンピロバクター菌数及び指標菌数の変動について検討した。

*1 チルド, -2~2°C; 冷凍, クラストフリージング, <-15°C.

*3 チルド処理群・クラストフリージング処理群間で有意差 (p<0.05) を認めた数値を太字で記す。

表2. クラストフリージングによる食鳥部分肉中の自然汚染カンピロバクター低減効果 (B社)

処理群 ^{*1}	検体番号	カンピロバクター菌数(MPN count/g)		指標菌数(CFU/g)			
		数値	群内平均値	生菌数(群内平均値)		腸内細菌科菌群数(群内平均値)	
チルド処理群	1	0.46	0.646	7.56E+04	2.88E+04	1.00E+03	1.38E+03
	2	0.3		1.69E+04		1.70E+03	
	3	0.15		1.48E+04		8.00E+02	
	4	0.46		1.21E+04		1.30E+03	
	5	1.86		2.46E+04		2.10E+03	
クラストフリージング処理群	6	0.06	0.080	9.20E+03	1.68E+04	9.00E+02	3.04E+03
	7	0.15		2.21E+04		3.80E+03	
	8	0.06		1.14E+04		1.20E+03	
	9	0.072		1.12E+04		3.60E+03	
	10	0.06		3.01E+04		5.70E+03	

B社において生産・加工される同一ロットの食鳥モモ肉を対象として、クラストフリージング処理によるカンピロバクター菌数及び指標菌数の変動について検討した。

*1 チルド処理, -2~2°C; クラストフリージング処理, <-23°C・5分間

食鳥肉のカンピロバクターのリスク管理に関する研究 生食用として流通する食鳥肉の汚染実態調査

研究分担者 中馬猛久 鹿児島大学共同獣医学部

研究要旨

鹿児島県や宮崎県では鶏肉を生で供する鶏刺しが郷土料理として広く普及しており、飲食店で提供されるだけでなく一般的な小売店でも市販されているが、鶏刺しのカンピロバクター汚染率やそれを原因とする食中毒発生状況などを明らかにした基礎的データはない。本研究では、鶏刺しを含む生食用、加熱用それぞれの市販鶏肉のカンピロバクター汚染状況を明らかにすることを目的とした。鹿児島県内小売店にて購入した生食用鶏肉、加熱用鶏肉を材料とし、半定量的に汚染度を推測した結果、加熱用鶏肉に比べて生食用鶏肉のカンピロバクター汚染度は有意に低いことがわかった。生食用鶏肉において推定される菌数は最大 36 MPN/50g であった。カンピロバクター症の発症には一般に数百個の菌の摂取が必要であるとされており、生食用鶏肉によるカンピロバクター症の発症の可能性は低いと考えられた。このことから、県内小売店にて市販される生食用鶏肉はカンピロバクターの汚染を回避、あるいは低下させることができていると推察された。

A. 研究目的

近年、牛肉や豚肉の生食に関する問題が話題となっている。平成 24 年 7 月からは牛レバーの生食用としての提供、販売が禁止され、平成 27 年 6 月からはレバーを含めた豚肉の生食用としての販売、提供が禁止されている。これらの法改正は、牛については腸管出血性大腸菌、豚肉については E 型肝炎ウイルスといった公衆衛生上のリスクの高い危害要因の存在が理由として挙げられている。こういった流れから、カンピロバクター感染のリスクの高い鶏肉の生食への関心も高まっていると考えられる。

鹿児島県や宮崎県といった南部九州地方では、昔から鶏肉を生で食す鶏刺しが郷土料理として存在しており、一般に食される文化がある。南部九州地方では鶏刺しは小売店や居酒屋で普通

に見られ、東京や大阪といった都市部でも提供を行う居酒屋が多く存在する。鶏刺しは鶏のもも肉、むね肉、ささみといった部位を用い、表面を湯引きや火で炙るなどして加熱してあることが多い。これによって、鶏肉の表面に汚染したカンピロバクターを殺菌し、食中毒のリスクを下げていると考えられる。カンピロバクター感染の主な原因食品として鶏刺しは注目されるが、実際に鶏刺しが原因であると特定される事件は多くない。また、一般に流通している鶏刺しのカンピロバクター汚染率やその菌数といった基礎的データを調査した報告はほとんどなく、今後これらを明らかにすることは食品衛生上重要な課題である。そこで、鹿児島県内小売店に流通する生食用鶏肉のカンピロバクター汚染状況を半定量的に推定した。また、加熱用鶏肉についても同様の手

法で汚染状況を調査し、生食用との汚染状況の比較を行った。

B. 研究方法

材料は鹿児島県内小売店 8 店舗にて購入した生食用鶏肉 35 検体、加熱用鶏肉 41 検体の計検体である。購入した鶏肉については日付、品名、販売店、加工会社の記録をした後、購入日中に試験に供した。

本研究では、MPN 法を応用し、半定量的にカンピロバクターの汚染菌数を推定した。まず鶏肉 50g (肝臓、ミンチ肉については 5g) をプレストン液体培地 50ml の入った袋にいれ、ストマッカーにて十分に混和した。肝臓、ミンチ肉を 5g としたのは、肉が完全に溶解してしまいプレストン液体培地での培養が困難になってしまうことを避けるためである。混和後のプレストン液体培地を 10ml ずつ 3 本の試験管に分注し、これらを 42°C の好気条件下にて 48 時間培養を行った。培養後、1 白金耳をとって mCCDA 培地に分画し、再び 42°C の好気条件下にて 48 時間培養を行った。mCCDA 培地にてカンピロバクター様のコロニーが認められたものについては、位相差顕微鏡を用いた菌体の観察、および *C. jejuni*, *C. coli* 同定のための PCR を行った。よって、1 検体あたり 3 本の培養を行っており、この 3 本中何本がカンピロバクター陽性であったかを判定することにより、数の推定を行った。

C. 研究結果

生食用鶏肉では 35 検体中 28 検体(80.0%)が陽性数 0 本であった。3 本中 1~2 本陽性だったものはそれぞれ 4 検体(11.4%)、3 検体(8.6%)であった。3 本とも陽性を示したものはなかった。また、陽性を示した 7 検体のうち 6 検体は *C. jejuni* で、残りの 1 検体は *C. coli* であった。

加熱用鶏肉 41 検体のなかで 3 本全て陰性だったのは 12 検体(29.3%)、3 本中 1 本陽性だった

のは 3 検体(7.3%)、2 本陽性だったのは 2 検体(4.9%)で、全て陽性だったのは 24 検体(58.5%)であった。また、陽性を示した 29 検体のうち 25 検体は *C. jejuni* で、残りの 4 検体は *C. coli* であった。

MPN 3 本法における陽性本数と推定菌数の関係をもとに、おおまかな菌数を予想すると、10ml で陽性本数が 0 本だった場合、菌数は 3 未満から 9 MPN/50g の間、3 本中 1 本陽性だったものの菌数は 4 から 16 MPN/50g の間、3 本中 2 本陽性だったものの菌数は 9 から 36 MPN/50ml の間、陽性本数が 3 本だった場合、菌数は 23 から 1100 以上の MPN であったと推定される。

(図1)

生食用鶏肉のカンピロバクター汚染度は最大でも 36 MPN/50g であると推測される。

生食用鶏肉について加工会社ごとにカンピロバクター汚染率の比較を行ったところ、差は見受けられなかった。

D. 考察

今回の結果から、生食用鶏肉のカンピロバクター汚染度は、加熱用鶏肉に比べて十分に低いことがわかった。これは、解体の手法や表面を加熱する工程などによってカンピロバクターの菌数が抑えられていることからだと考えられる。一般的に、健康な成人がカンピロバクター症を発症するのに必要な菌数は数百であると言われており、今回の 50g あたり最大で 36 MPN/50g という結果は、たとえカンピロバクターに汚染されていた場合でも、通常であれば問題のない菌数に抑えられている結果だと言える。しかしながら、鶏肉の生食に関する法的規制が存在しておらず、一部の業者で加熱用鶏肉を鶏刺しとして提供されている可能性は否定できない。そのため、現在、居酒屋などで鶏刺しとして提供されるもの全てが安全であると言える状況ではないかもしれない。

今回の結果から、適切に処理すれば鶏刺しは

安全であると考えられるため、今後、適切な処理がどのようなものか明確にし、安全な鶏刺しを安定して供給できる制度を整えることが必要になるだろう。そのために今後、さらなる現状の具体化のために検体数を増やしていくとともに、菌数の測定を行うことが必要となる。

2. 実用新案登録
なし

E. 結論

鹿児島県内に流通する生食用および加熱用鶏肉製品を対象にカンピロバクターの半定量検出試験を実施した。結果として、生食用鶏肉検体の汚染状況は加熱用検体に比べて総じて低いと想定された。こうした低い汚染実態を裏付ける上では、食鳥肉の解体～加工・流通に至る衛生管理状況の確認と表面焼烙或は湯引きによる低減効果の検証が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表等

無し

2. 学会等発表

・「鹿児島県内で市販される生食用鶏肉のカンピロバクター汚染状況」第63回日本獣医公衆衛生学会(九州). 平成26年10月16日(熊本)

・「生食用と加熱用鶏肉におけるカンピロバクター汚染状況の比較」第8回日本カンピロバクター研究会. 平成27年12月3日(京都市)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

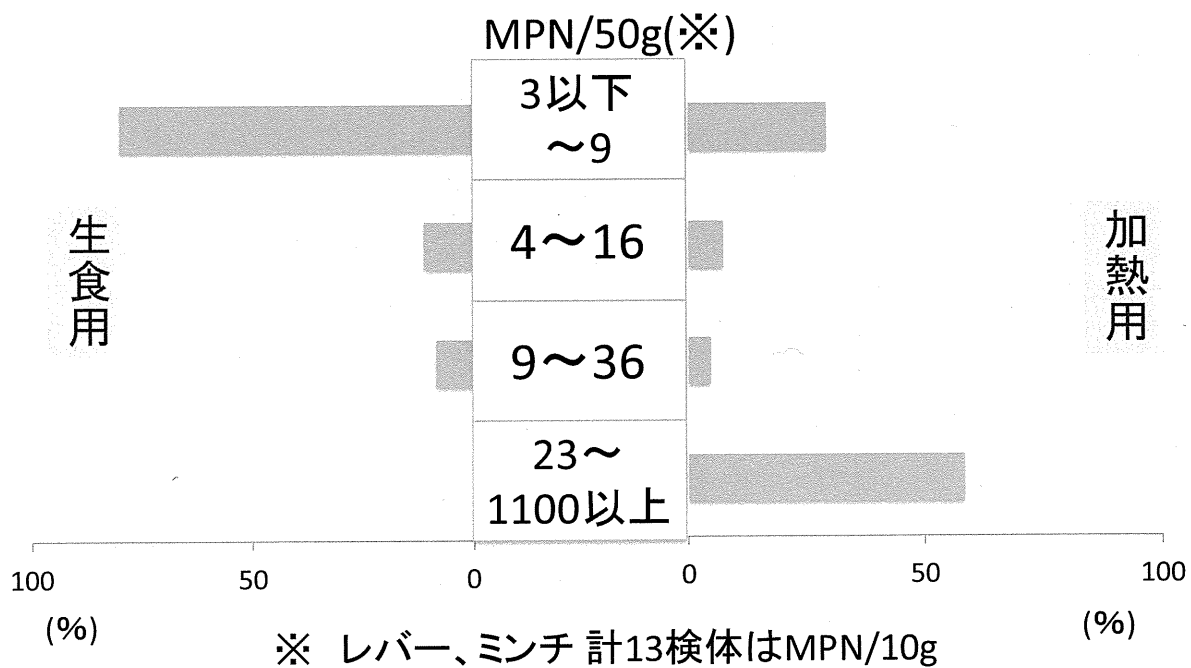


図1. 各鶏肉におけるカンピロバクター汚染度の比較

表1. 各鶏肉のカンピロバクター分離状況.

鶏肉	検体数	3本中のカンピロバクター陽性数			
		0	1	2	3
生食用	35	28	4	3	0
加熱用	41	12	3	2	24
合計	76	40	7	5	24

表2. 分離されたカンピロバクターの同定.

鶏肉	検体数	陽性数	菌種	
			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
生食用	35	7	6	1
加熱用	41	29	25	4

表 3. 生食用鶏肉の加工会社による比較.

	検体数	3本中のカンピロバクター陽性数			
		0	1	2	3
A社	14	12	2	0	0
B社	11	9	1	1	0
その他	10	7	1	2	0
合計	35	28	4	3	0

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
朝倉宏、山本詩織、橘理人、吉村昌徳、山本茂貴、五十君静信.	冷凍処理による鶏肉中でのカンピロバクター汚染低減効果に関する検討.	日本食品微生物学会雑誌	32	159-166	2015
Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S.	Ex vivo proteomics of <i>Campylobacter jejuni</i> 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut.	Res Microbiol.	167	63-71	2016

=原 著=

冷凍処理による鶏肉中での カンピロバクター汚染低減効果に関する検討

朝倉 宏^{*1,†}・山本詩織^{*1}・橘 理人^{*1}・
吉村昌徳^{*1,2}・山本茂貴^{*3}・五十君静信^{*1}

(^{*1}国立医薬品食品衛生研究所, ^{*2}日本冷凍食品検査協会関西事業所, ^{*3}東海大学)

(受付: 平成27年4月3日)

(受理: 平成27年7月30日)

Studies on Efficacy of Freezing on the Reduction of *Campylobacter jejuni* in Chicken Meat

Hiroshi ASAKURA^{*1,†}, Shiori YAMAMOTO^{*1}, Masato TACHIBANA^{*1},
Masanori YOSHIMURA^{*1,2}, Shigeki YAMAMOTO^{*3} and Shizunobu IGIMI^{*1}

(^{*1} National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501;

†Corresponding author)

(^{*2} Japan Frozen Food Association Kansai Branch, 3-2-6 Minatojima
Minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047)

(^{*3} Tokai University, 3-20-1 Orido, Shimizu-ku, Shizuoka 424-0902)

Here we examined the efficacy of freezing treatment to reduce the survival of *Campylobacter jejuni/coli* in chicken meat. Spike experiments showed approximately 1.9-2.3 log CFU/g reduction of *C. jejuni* NCTC 11168 and 81-176 strains in minced chicken meats following the freezing at -20°C for 2 weeks. This freezing condition also induced significant reduction of bacterial detection ratio in commercially-distributed minced chicken meats that exhibited 40% positivity for *Campylobacter* spp. as natural contamination. Furthermore, crust freezing procedure decreased numbers of *Campylobacter* spp. in chicken meats and offal, compared with those in chilled chicken samples, although indicator bacterial counts did not correlate with the different treatments. Qualitative detection of *Campylobacter* spp. resulted that imported frozen chicken thigh samples showed only 2.2% positivity while domestically-produced chilled samples were 26.7% positive for those bacteria. Together, these data clearly indicated that freezing treatment consecutively reduced survival of the thermophilic *Campylobacter* in chicken meats. Practical application of this treatment would be helpful to control of this pathogen in chicken meats.

Key words: *Campylobacter*, chicken meat, freezing, survival

緒 言

国内で発生する食中毒事例の中で、カンピロバクター・ジェジュニ/コリによるものは、事例数が最も多い傾向が近年続いており¹⁾、その対策が求められてい

る。本菌は、鶏や牛などの家禽や家畜の腸管内に広く分布しており⁴⁾、これら食鳥肉・食肉の生産・解体・加工処理・流通・消費過程といったフードチェーンを通じ、ヒトへの感染をあらわす。分子疫学研究の進展に伴い、英国や米国における本食中毒の原因食品としては、鶏肉が最も高い比率で介在することが明らかになりつつある^{3, 2)}。わが国においても、同様に食鳥肉はカンピロバクター食中毒の主たる原因食品と目され¹⁾、その生産～消費を通じた総合的な制御対策が本食中毒低減を図るう

*1 158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

*2 650-0047 神戸市中央区港島南町3-2-6

*3 424-0902 静岡市清水区折戸3-20-1

えでの最重要課題となっている。

わが国では、食品安全委員会により、2009年に鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリに関する食品健康影響評価書が策定され、各段階での対策案の例示とともに、各手法による汚染リスク低減効果の評価がなされている¹⁵⁾。食鳥処理過程における対策例としては、汚染鶏・非汚染鶏の区分処理（予測低減率44.0%）や冷却水の塩素濃度管理の徹底（同21.4%）などが交差汚染の低減に資するものとして挙げられている。一方、国内における食鳥肉生産の管理体制上、前者の実行性は乏しく、現実的な対策としては成立し難い状況にある。また、その下流にあたる調理・喫食段階での対策例としては、一般的な交差汚染の防止に加え、加熱の徹底（生食あるいは加熱不十分な調理の回避）が汚染リスク回避の有効な手段として挙げられており、リスクコミュニケーション活動を通じて、十分な加熱の必要性が消費者に対して啓発されている。しかしながら、わが国や韓国などの一部の国・地域では、食鳥肉の生食が食習慣として根づいており、生食用として提供される食鳥肉に対しても一定の対策を検討する必要性が議論されているところである。

本研究では、流通段階における本菌の制御対策として、冷凍処理が海外3カ国（アイスランド、デンマーク、ニュージーランド）において既に導入・運用されていること^{2, 22, 23)}、そして馬肉では寄生虫汚染制御のための対策として冷凍処理法が通知・運用されている実態¹⁰⁾を踏まえ、冷凍処理を通じた鶏肉中のカンピロバクター生存挙動に関する諸検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 添加回収試験

(1) 検体の調製

都内で市販される冷凍鶏挽肉を購入し、冷凍機器を用いて、20時間・ -20°C にて冷凍処理を行った後、 4°C で自然解凍した。同様の冷凍・解凍処理を再度実施後、検体25gを1検体として、カンピロバクター・ジェジュニ/コリの定性試験をISO 10272: 2006-1に準じたNIHSJ-02-ST4: 2012¹⁴⁾により行い、自然汚染がないことを確認した後、添加回収試験における食品マトリックスとして用いた。なお、当該試験は試料25gに対し、プレストンブロス(Oxoid)100mlを用いて 42°C で増菌培養後、mCCDA培地(Oxoid)およびスキロー寒天培地(Oxoid)を用いて分離培養を行い、定型的集落を5個釣菌して、鑑別試験を行うものである。

(2) 試験方法

本研究では、*C. jejuni* NCTC 11168株および81-176株を野外代表株として用いた。ミューラーヒントンブロス(OXOID)中で16時間、微好気培養を行い、各菌株を鶏挽肉検体25gに $1.0\text{--}1.1 \times 10^7$ CFU/gとなるよう添加した後、速やかに -20°C の冷凍庫内で冷凍保存した。0, 1,

2, 5, 7, および14日間冷凍保存後、各5検体を 4°C にて4時間自然融解させ、ISO 10272-2: 2006⁸⁾に従い、定量検出試験を行った。本定量試験では、検体25gに9倍量の緩衝ペプトン水(BPW)を加えて10倍乳剤を作成した後、同液100 μl をmCCDA培地2枚に塗抹し、 41.5°C で48時間微好気培養を行った。発育集落数を求めたうえで、定型的な5集落を釣菌し、確定試験（形態、運動性、 25°C および 41.5°C での増殖試験、ならびにオキシダーゼ試験）に供することで、生存菌数を求めた。また、低菌数接種群の検討にあたっては、上述の2菌株を $1.7\text{--}1.8 \times 10^3$ CFU/gとなるよう、鶏挽肉25gに接種し、冷凍保存に供した。また、菌株間での冷凍抵抗性の差異を検討するため、鶏肉由来*C. jejuni*計20株¹⁾を用いて、上述の高濃度接種群と同様に冷凍保存試験を行い、冷凍2日および7日後の検体における接種菌株の生存菌数を求めた。

(3) EMA-PCR法を用いた生存菌の確認

上述の高濃度接種菌添加検体を同様に作成した後、0, 1, 2, 5, 7, 10, 14日間、 -20°C にて冷凍保存した。保存検体25gに対し、100mlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を添加・混和後、同懸濁液1mlより、Fukushimaらの方法⁵⁾に準じて、菌体群集を食品残渣より分離した。得られた菌体懸濁液100 μl を各40 μl となるよう2系統に分け、一群はエチジウムモノアザイド(EMA)を主体とする、Viable *Campylobacter* Selection Kit for PCR (タカラバイオ)を用いて、指示書に従ったEMA標識処理を行い、もう一群は15 μl のPBSを加え、無処理群として氷上で保存した。NucleoSpin Tissue XS kit (MACH-EREY-NAGEL)を用いて、各群よりDNAを精製した後、同溶液1 μl を鋳型DNAとして、Cycleave[®] PCR *Campylobacter* (*jejuni/coli*) Typing Kit (タカラバイオ)を用いた定量PCR反応に供した。同反応には、Light-Cycler 480 (ROCHE)を用い、各検体における(EMA標識群定量値/無処理群定量値)より生存率を求めた後、冷凍処理0日目検体における培養菌数(検体へ接種後、速やかに回収し、得られた菌数)を生存率100%と仮定したうえで、各検体の生存菌数を算出した。

2. 冷凍処理による鶏挽肉のカンピロバクター汚染の低減効果

市販チルド鶏挽肉5kgを入手し、検体あたり25gとして、50検体をNIHSJ-02-ST4: 2012に従って、カンピロバクター定性試験に供した（無処理対照群、Non-frozen control, Fig. 3）。このうち、計5検体を採材し、ISO 10272-2: 2006に従い、カンピロバクター定量検出試験を実施した。その後、同一ロットより、検体あたり25gとなるよう、滅菌ストマッカー袋に入れ、 -20°C 下で0, 1, 7日間保存した（各群50検体）。保存後、各検体は 4°C で3時間自然解凍させ、NIHSJ-02-ST4: 2012に従って、カンピロバクターの定性検出試験に供した。なお、0日目検体の数値は冷凍前検体からの回収菌数を指してい

る。

3. 急速冷凍およびチルド処理を行った検体間での汚染菌数の比較

国内の食鳥処理加工工場にて、食鳥処理後に急速冷凍処理(Crust freezing)あるいはチルド処理を行った同一ロットの鶏部分肉(モモ、ムネ、ササミ、レバー、砂肝)各500gを500mlのニュートリエントブイヨンNo.2(OXOID)に懸濁した後、同懸濁液10ml, 1ml, 0.1mlを100mlのプレストンプロス(ニッセイバイオ)に3本ずつ加え、42℃で48時間微好気培養した。培養液を白金耳でmCCDA培地に塗布後、42℃で48時間微好気培養を行い、各平板より5集落を釣菌し、コロニーPCR法⁹⁾による確認試験を行った。最終的に、各検体における汚染菌数は最確数法により求めた。また、上述の2倍希釈懸濁溶液については、EasySpiral[®](INTERSCIENCE)を用いて、100 μ lずつ標準寒天培地(OXOID)、VRBL寒天培地(OXOID)、VRBG寒天培地(OXOID)に塗布し、それぞれ35℃, 44℃, 35℃で24時間好気培養を行い、一般生菌数、大腸菌群数、腸内細菌科菌群数を求めた。本試験では、カンピロバクター・指標菌ともに、各群3検体を試験に供し、平均値および平均誤差を求め、群間比較には、*t*-検定を用い、*p*値<0.05を有意差ありと判定した。

4. 輸入冷凍および国産チルド鶏肉検体間での比較定性試験

2014年5月~8月の間、都内で市販される輸入冷凍鶏モモ肉および国産チルド鶏モモ肉(Table 2)を45検体ずつ購入し、10℃以下で実験室へ搬入し、速やかにNIH-SJ-02-ST4:2012に従い、カンピロバクター定性検出試験へ供した。なお、冷凍検体については、4℃で3時間自然解凍した後、当該試験に供した。

結 果

1. 冷凍処理を通じた鶏挽肉中*C. jejuni*の生存挙動

冷凍処理を通じた、国産鶏挽肉中における*C. jejuni* NCTC 11168株および81-176株の生存挙動を異なる接種菌数を用いて各群5検体として検討した。高菌数接種群(7.00-7.05対数個/g)における接種菌の生存菌数平均値は、冷凍1日後で6.77-6.80対数個/g、7日目には6.07-6.40対数個/gとなり、14日目には5.91-6.06対数個/gと、接種菌数に比べて、検体1gあたり0.99-1.09対数個の減少を示した(Fig. 1A)。低菌数接種群(3.24-3.26対数個/g)における生存菌数は、冷凍1日後で2.65-2.72対数個/g、7日後で1.99-2.16対数個/gとなり、同処理14日後には1.00-1.38対数個/gと、接種菌数に比べて検体1gあたり1.88-2.24対数個の減少を示した(Fig. 1B)。膜損傷性を指標とするEMA-PCR法により、高菌数接種群を対象として併せて検討したところ、冷凍2, 7, 14日後における換算生存菌数はそれぞれ6.58-6.68対数個/g, 6.28-6.40対数個/g, 5.73-5.95対数個/gとなった(Fig.

1C)。以上より、冷凍処理を通じ、国産鶏挽肉中において、カンピロバクター・ジェジュニ供試菌株の生存性は経時的に低減することが示された。

2. *C. jejuni*菌株間での冷凍感受性差異

ニワトリ由来*C. jejuni*計20菌株を用いて、冷凍処理を通じた鶏挽肉中の生存性に関する比較を行った。7.23-7.26対数個/gの各菌株を接種後、冷凍処理に供したところ、菌株間での冷凍生残性は、同処理2日で顕れ、P_0016株が6.64対数個/gの生存菌数を示したのに対し、P_0052株の生存菌数は5.77対数個/gであった(Fig. 2)。P_0016株の生存菌数については、冷凍7日後も6.47対数個/gと、接種菌数に比べ約0.78対数個/gの低減にとどまった(Fig. 2)。一方、冷凍7日後に最も顕著な菌数減少を示したP_0052株の生存菌数は5.26対数個/gと、接種菌数から約1.96対数個/gの低減を示した(Fig. 2)。以上より、鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニの生存性は、冷凍処理を通じ、菌株間で差異を認めながらも、経時的な減少傾向を示した。

3. 冷凍処理によるカンピロバクター汚染の低減効果

市販チルド鶏挽肉50検体を対象に、カンピロバクター汚染定性試験を実施したところ、20検体が陽性を示した(陽性率40%)(無処理群=Non-frozen control, Fig. 3)。このうち、5検体については、定量試験に供し、0-46 MPN count/g(平均23.4 MPN counts/g)のカンピロバクター汚染が認められた。当該鶏挽肉検体を対象として、1日または7日間の冷凍処理を行い、カンピロバクター陽性検体数を定性的に検討したところ、1日・7日冷凍処理群(各50検体)の陽性検体数は、それぞれ12検体および6検体となった(Fig. 3)。

4. 急速冷凍による生残菌数の低減効果

食鳥処理直後に、Crust freezingにより、表面のみを急速冷凍させた(急速冷凍処理群)、またはチルド(10℃以下)状態で処理された(チルド処理群)、同一ロットの食鳥部分肉(モモ、ムネ、ササミ、レバー、砂肝)について、カンピロバクターおよび衛生指標菌(一般生菌数、大腸菌群数、腸内細菌科菌群数)の定量試験を行った。カンピロバクター検出菌数として、チルド処理群では、ムネおよびササミ検体ではそれぞれ0.68 MPN count/gおよび0.27 MPN count/gであり、他部位(モモ、レバー、砂肝)は11.00 MPN count/gであった(Table 1)。急速冷凍処理群における同菌数は、ムネ、砂肝、ササミでそれぞれ0.11 MPN count/g, 0.16 MPN count/g, および0.19 MPN count/gであり、モモおよびレバーにおける菌数は11.00 MPN count/g, 3.10 MPN count/gであった(Table 1)。指標菌数のうち、一般生菌数は、チルド処理群が3.66-4.78対数個/g(平均値4.21対数個/g)であったのに対し、急速冷凍処理群では2.76-4.89対数個/g(平均値3.55対数個/g)であった(Table 1)。また、部位別の比較では、モモ検体における一般生菌数は他部位に比べ高値を示し、ササミおよび砂肝