

平成27年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
総括研究報告書

食鳥肉におけるカンピロバクター汚染のリスク管理に関する研究

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、食鳥肉の生産・処理・流通の各段階において、カンピロバクター汚染低減に資する衛生管理手法に関する科学的知見の集積を図り、より衛生的な食鳥肉の生産～消費に至るフードチェーンの在り方に関する提言を行うことで、本食中毒低減に資するガイドライン策定等の厚生労働行政に寄与することを目的として、本年度より研究を開始した。研究班では、食鳥肉に関わるフードチェーンを、(1)養鶏農場での生産段階、(2)食鳥処理場における解体段階、(3)加工・流通段階、(4)消費段階、の4つに区分した上で、それぞれの工程における汚染低減手法に関する情報・データ収集を行うこととしている。

本年度は、以下の研究成果を得た。(1)生産段階においては、国内7養鶏農場より出荷されるブロイラー鶏盲腸便を対象に、カンピロバクター検出試験を行い、本菌陽性・陰性農場の識別を行った。その上で検体構成菌叢を農場別に比較し、*Bacteroides*属菌の構成比率と、カンピロバクター保菌との間に関連性を見出した。更に、本菌陰性農場1農場で飼養時期別に盲腸便を採材し、鶏の発育に伴う盲腸内菌叢変動を追跡したが、何れの日齢においても*Bacteroides*属菌が最も優勢である実態を把握した。当該属菌はヒトやマウス等における腸内環境の健全性を図る指標としても用いられており、本属菌を指標とした飼養管理は、鶏腸内環境の健全性評価に加え、カンピロバクターの保菌状況を探る術として期待される。(2)食鳥処理段階では、国内の食鳥処理場に導入されている複数の食肉処理機器メーカーを訪問し、聞き取り調査を実施した。現在、我が国の当該施設の多くでは、世界的に展開している大規模な処理製造機器メーカー製が汎用されていること、そして一つの食鳥処理場に複数のメーカーの機器が導入されていることもあること、機器の技術進歩は目覚ましく、食鳥検査制度が導入された平成4年当時と比べ、各段に腸切れ等が生じない等、性能が向上している実態を把握した。国内で2施設しか設置されていない、エアークラーク導入食鳥処理場の一つを訪問し、聞き取り調査及び視察を実施し、と鳥は塩素水槽に一旦、手で付けた後にエアークラーク処理を行っていることを把握した。(3)加工・流通段階では、食鳥肉加工施設に既設のクラスト冷凍装置および馬肉をはじめとして、多様な食品の冷凍処理に使用される、急速液体冷凍装置を用いて、鶏肉中のカンピロバクター汚染低減効果を検証した。計2食鳥肉加工施設に既設されるクラスト冷凍装置を用いることで、鶏部分肉を自然汚染するカンピロバクター菌数は施設或は部位の別を問わず、有意に低減を図る手法であることが示された。また、急速液体冷凍装置を用いた場合、鶏肉検体温度は速やかな低下を示し、緩慢冷凍に比べ品質への影響が少ないと目された。約7対数個/gのカンピロバクター株を接種した鶏肉検体中の生存菌数を、同処理過程で比較したところ、3時間処理による検体1gあたりの菌数低減値は1.10-2.19対数個となり、食鳥肉の加工から流通段階における冷凍手法の応用が鶏肉中のカンピロバクター低減に有効に機能しうることを示していると考えられた。(4)流通・消費段階では、南九州地方の郷土料理として根付く、鶏刺しが生食用として市販流通している実態を鑑み、同食品におけるカンピロバクター汚染状況の把握に関する検討を行った。鹿児島県内小売店にて購入した鶏刺しを含む生食用および加熱用鶏肉を対象として、半定量的に汚染度を推測した結果、加熱用鶏肉に比べて、生食用鶏肉の汚染度は有意に低く、推定汚染菌数は最大で36MPN/50gであった。生食用鶏肉の多くは表面を焼烙していること他、食鳥肉の解体～加工工程においても衛生的な取扱いが行われていることなどが、同数値として顕れていると推察された。

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

五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所
猪子 理絵 北海道 帯広食肉衛生検査所
川本 恵子 帯広畜産大学
倉園 久生 帯広畜産大学
小西 良子 麻布大学
古茂田 恵美子 東京家政大学
坂野 智恵子 群馬県食肉衛生検査所
品川 邦汎 岩手大学
杉本 治義 群馬県食肉衛生検査所
鈴木 智之 滋賀県衛生科学センター
橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所
茶園 明 NPO 法人日本食品安全検証機構
中村 広文 群馬県食肉衛生検査所
藤田 雅弘 群馬県衛生環境研究所
村上 覚史 東京農業大学
横田 陽子 群馬県食肉衛生検査所
山本 詩織 国立医薬品食品衛生研究所
吉村 昌徳 日本冷凍食品検査協会
渡辺 邦雄 NPO 法人日本食品安全検証機構

(敬称略、五十音順)

A. 研究目的

食鳥肉の喫食に因るカンピロバクター食中毒は例年多発しており、その対策が大きな社会的課題となっている。これに関連する国際情勢としては、コーデックス委員会により2011年にフードチェーンを通じた食鳥肉の衛生対策ガイドラインが発行されている(CAC/GL 78-2011)他、わが国では2009年に食品安全委員会により、鶏肉におけるカンピロバクター汚染に関するリスク評価書が取り纏められている。前回の研究班(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)においては、特に食鳥肉における本菌汚染状況の改善に向けて、今後検討されるべきとして、食品安全委員会のリスク評価書において提案された検討課題の有効性を、農場・食鳥処理・流通の各段階で検証し、農場における汚染制御は未だに困難であるが、食鳥処理場へ搬入される時点での汚染・非汚染鶏群の識別と区分処理が可能であれば、交叉汚染を制御する上で有効に機能する点、そして流通段階で活用が想定される冷凍処理が一定の汚染低減に資するであろうとの見解を得た。同研究班では、畜産食品に関連する複数の課題が含まれ、その衛生管理という全容の改善を目的としていた。これに対し、本研究班では、これまでに蓄積された研究成果を、食鳥肉におけるカンピロバクターのリスク管理という点に集約させることで、生食或いは加熱不十分な食鳥肉の喫食に基づくカンピロバクター食中毒の制御を命題として、生産から流通工程に至るフードチェーンの中において、実行性を伴った衛生管理の在り方を提言すると共に、その実施により想定される汚染低減効果を予測し、有効性を明らかにしようとするところに特色がある。より具体的には、食鳥肉の生産・解体処理・加工・流通・消費等の各プロセスにおける情勢を把握すると共に、汚染低減に資するハード・ソフト両面での対策の在り方について例示を行う等、応用的汚染低減手法の具体的提案等を網羅し、厚生労働行政として対応が求められる、衛生的な食鳥肉処理に関するガイドラインの策定等に寄与するための科学的知見の集積を図る。ま

た、生食としての鶏肉の消費実態を鑑み、本研究では、生食用鶏肉として市販流通する製品の汚染実態を把握すると共に、当該製品の解体～加工にあたって実施される衛生管理手法に関する情報収集も含めた検討を行うこととしている。

以下に、各プロセスに応じた研究目的等を記す。

(1) 農場段階

養鶏農場における本菌汚染対策については、農林水産省により進められている、農場版HACCPの普及をはじめ、種々の飼養管理向上のための対策により、検討されているが、農場への本菌の侵入経路あるいは鶏舎間伝播様式等には不明な点が多いことから、更なる知見の集積が求められている。

鶏生体での本菌の汚染（定着）制御については、これまでも乳酸菌やバシルス属菌等の生菌剤の投与により、一定の抑制効果を果たすことが報告されている。こうしたプロバイオティクス効果を裏付ける分子基盤の一端も明らかにされつつあるが、それらの実用性については依然として定かではない。また、上述の乳酸菌等に加え、近年ではカンピロバクターの鶏腸管定着に抑制作用を示す常在細菌叢も一部報告されつつあり、生産段階での制御策の構築にあたって期待がもたれる研究分野の一つとなっている。こうした背景より、本研究では、出荷時齢のプロイラー鶏を対象として、計7養鶏農場で鶏盲腸便を採材し、カンピロバクター保菌状況を検証すると共に、陽性・陰性農場間で菌叢を比較し、本菌定着と関連性を示す菌叢の探索を行うこととした。

(2) 食鳥処理段階

カンピロバクター食中毒の主な原因食品は、本菌汚染を受けた鶏肉であると解される。本菌は食鳥と体や市販鶏肉に高率に分布しており、冷蔵庫内でも長期間生存すること、比較的少量の菌量の摂取によって発症させること等から食品衛生上、対策を講じる必要性が高い。

鶏が農場に導入された時点の初生ヒナではカンピロバクターはほとんど検出されないが、飼育週令が増すごとにカンピロバクターを腸管内に保菌す

るようになり、飼育後2-3週目で菌の排出がはじまり、その後急速に感染が拡大することが知られている。カンピロバクターは腸管内に生息していることから、食肉処理工程で腸管内容物からのと体への汚染や冷却工程によるチラー水の汚染により多くのと体への汚染が考えられる。

以上のことから、今年度は鶏の内臓摘出処理機器メーカーへの聞き取りおよび我が国で数少ないエアータッチャーを設置している食鳥処理場への聞き取り調査を実施した。

(3) 加工・流通段階

食鳥肉の加工・流通段階におけるカンピロバクター対策として、冷凍処理の義務化を導入したアイスランド、デンマーク、ニュージーランド各国では、カンピロバクター食中毒の低減を果たした実績があることから、同処理法に関する知見の集積をはかることとした。前回の研究班では、いわゆる緩慢冷凍装置である、空冷式の研究用冷凍庫を用いて汚染低減効果をはかったが、食鳥肉の加工・流通段階において導入・運用されている冷凍装置を用いた際の低減効果については、これまでに報告されていない。こうした背景を下に、本研究ではクラスト冷凍装置および急速液体冷凍装置を用いた鶏肉中のカンピロバクター生存性に関して検討を行うこととした。

(4) 流通・消費段階

鹿児島県や宮崎県といった南九州地方では、昔から鶏肉を生で食す鶏刺しが郷土料理として、一般に食される。同地方での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圏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・むね・ささみ等の部位を用い、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の一部を殺菌し、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、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殆どなく、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

1. 農場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 盲腸便試料の採取

平成27年9月～12月の間に、北海道・東北、関東及び九州地方にある養鶏場計7農場(北海道・東北地方のA農場、九州地方のB・C農場、関東地方のD-G農場)より、出荷時齢鶏盲腸便の採材に関する協力を得た。このうち、B農場では有薬飼料を給餌した鶏群と、無薬飼料給餌群の双方が同一農場内で飼育されていたことから、双方を採材対象とした。また、A農場については、特定の鶏舎を対象として、後期飼料切替2日後である18日齢、仕上飼料(抗生物質不含)切替3日後である28日齢、仕上飼料切替7日後である32日齢、出荷4日前である46日齢、出荷時(50日齢)を対象に各10検体の盲腸便を採材し、試験に供した。新鮮盲腸便の採材にはシードスワブを用い、採材後は速やかに冷蔵温度帯で研究室に輸送した。輸送シードスワブは、速やかに1mLの滅菌リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)に懸濁した。

2) 分離培養

上記シードスワブ懸濁液 0.5mL を 10mL のプレストン培地に加え、42℃にて48時間、微好気培養を行った。その後、同培養液を1白金耳分、mCCDA寒天培地に塗布し、42℃で48時間微好気培養を行った。培養後、各検体につき典型的発育集落を5つ鈎菌し、継代培養後、生化学性状試験及びPCR法による菌種同定を行い、陽性・陰性を判定した。

3) DNA抽出

1)で調整した懸濁溶液残液より、DNA抽出を行った。また、分離株についても、同様にDNA抽出を行い、MLST解析に供した。

4) MLST解析

Campylobacter MLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>) に記載

される方法に従い、計7遺伝子の部分配列を増幅した。ExoSAP-ITを用いた酵素処理後、各増幅産物にシーケンス用プライマーセットならびに BigDye Terminator を加え、ABI3730xを用いたサイクルシーケンス法により、対象増幅産物の塩基配列を決定した。得られた配列情報は、CLC MLST module を搭載した Main Workbench にて、アセンブル・アノテーションを行い、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。

5) 菌叢解析

盲腸便スワブ懸濁溶液より抽出した DNA を鋳型として、16SrRNA799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 反応を行い、増幅産物を精製した。同精製物は、定量後、30 検体を上限として等量から成る混合ライブラリーを作成し、Ion Chef / Ion PGM システムを用いた barcoded pyrosequencing 解析に供した。取得配列データについては、CLC Genomic Workbench を用いて不要配列を除去した後、RDP Classifier pipeline を介して、リード配列の階級付けを行った。その後、Metagenome@KIN を用いてクラスター解析を行った。

2. 食鳥処理段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 鶏内臓摘出処理機器メーカーへの聴き取り調査

2015年10月および12月にプライフーズ株式会社ゴードックスカンパニー(メイン社を主力に輸入・販売)ならびにマレルジャパン株式会社(ストック社を主力に輸入・販売)を訪問し、今日普及している食鳥処理機器の性能について聞き取りを行った。また、我が国では輸入代理店の無いBAYLE社製についてフィリピンの食鳥処理場を8月に訪問し、見学するとともに輸入代理店の技術者と面会し、情報を得た。

2) エアーチラー設置食鳥処理場の訪問

平成27年12月に(株)大山どり(鳥取県米子市淀江町)を訪問し、聞き取り調査および見学を実施した。

3 .加工・流通段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 検体温度測定

鶏モモ肉検体 (25 g) の中心部に記録機能を有する温度ロガー (SK-L200 、佐藤計量器製作所) を穿刺後、同検体をストマッカー袋に入れ、卓上脱気真空包装機 (SQ-202、シャープ株式会社) を用いて密閉した。その後、 - 35 に予冷した急速液体冷凍機 (リジョイスフリーザー、米田工機) に浸漬または - 20 の空冷式冷凍庫内で 3 時間冷凍保存を行った。同処理中における温度記録については、解析ソフトウェアに出力した。

2) カンピロバクター生存菌数の測定

ヒト臨床由来カンピロバクター・ジェジュニ計 5 株をミューラーヒントン寒天培地 (MHA) 中で 16 時間、37 で微好気培養を行い、各菌株を滅菌ストマッカー袋に入った鶏モモ肉検体 25 g に約 7 対数個/g となるよう添加した。接種検体は速やかに卓上脱気真空包装機を用いて密閉後、 - 35 に予冷した急速液体冷凍機に浸漬、或いは - 20 の空冷式冷凍庫に入庫した。0, 3, 6, 24 および 48 時間保存後、流水で 5 分間融解させ、検体 25 g に 2 倍量の PBS を加えて 2 倍乳剤を作成した後、PBS で 10 倍段階希釈し、同液 100 μ l をバンコマイシン 10 μ g/ml、テトラサイクリン 20 μ l/ml、バシトラシン 10 μ l/ml を添加した MHA に塗布し、37 で 48 時間微好気培養を行った。発育集落数を求めた上で、定型的集落については、DrySpot を用いた免疫凝集反応試験を行った。また、急速液体冷凍処理に伴う PBS および 10 % ドリップ加 PBS 10 ml 中での本菌生存挙動を検討するにあたっては、上述と同様に添加し、急速液体冷凍機で冷凍保存後、流水で 1 分間融解させ、生存菌数を求めた。なお冷凍 0 時間の数値は冷凍前検体からの回収菌数を指す。

3) 自然汚染丸鶏のカンピロバクター菌数の測定

市販の中抜き丸鶏 (1.2 ~ 1.4 kg) を 10 検体購入し、10 以下で実験室へ搬入した。滅菌ストマッカー袋に入れた後、速やかに急速液体冷凍機に投入し、3 時間保存した。対照群については、同時間、

4 下で保存を行ったものとした。10 分間流水で融解後、検体 1 羽あたり 10 倍量のニュートリエントブロス No.2 (Oxoid) を用いて十分に懸濁させ、同懸濁液 3 ml、300 μ l、30 μ l を 10 ml のプレストンブロスに 3 本ずつ加え、42 で 48 時間微好気培養した。同培養液 1 ml を採取し、鋳型 DNA を抽出した。PCR 法による定性検出を行い、各検体の汚染菌数は最確数 (MPN) 法により求めた。

4) クラストフリージング処理による食鳥部分肉におけるカンピロバクター低減効果の検証

国内の食鳥処理加工施設 (A 施設及び B 施設) にて、食鳥処理後にクラストフリージング処理あるいはチルド処理を行った同一ロットの鶏部分肉 (A 施設では、モモ・ムネ・ササミ・レバー・砂肝。B 施設では骨付モモ肉) をニュートリエントブイオン No.2 に懸濁後、同懸濁液 10ml, 1ml, 0.1ml を 100ml のプレストンブロス (ニッセイバイオ) に 3 本ずつ加え、42 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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、上述の段階希釈懸濁液を 100 μ l ずつ標準寒天培地、VRBL 寒天培地、VRBG 寒天培地に塗布し、それぞれ 35 $^{\circ}$ C、44 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C 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・指標菌共に、各群 3 検体を試験に供し、平均値及び平均誤差を求めた。なお、B 施設由来検体に関しては、一般生菌数及び腸内細菌科菌群数のみを指標菌定量検出の対象とした。

5) 統計処理

各測定値は、平均値および標準誤差を求め、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 .流通・消費段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

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 76 検体

である。購入した鶏肉については、各製品に記載されている日付、品名、販売店、加工会社等の情報を記録した後、同日中に試験に供した。

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 の微好気条件下にて 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 の微好気条件下にて 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 . 研究成果

1 .農場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) カンピロバクター陽性・陰性農場の識別

計 7 農場で採材された出荷時齢鶏盲腸便計 60 検体について、カンピロバクター分離を試みた。C・F・G 農場由来検体は全て陰性であったが、A・B・D・E 農場由来検体については、それぞれ 11 検体 (55%; 有薬群、3 検体 (陽性率 30%); 無薬群、8 検体 (80%))、10 検体 (100%)、6 検体 (60%)、8 検体 (80%) が陽性を示した。分離株は何れも *C. jejuni* であった。

以上の成績より、今回供試した出荷時齢の鶏盲腸便検体全体の陽性率は、58.3% (陽性検体 35 / 60 検体) となり、陽性・陰性農場 (鶏舎) はそれぞれ 4 および 3 農場であることが明らかとなった。

2) 農場別出荷時齢鶏盲腸便の構成菌叢比較解析

出荷時の鶏盲腸便検体の構成菌叢に関する知見を得るため、C-F 農場由来検体より、各 3 検体を無作為に抽出し、16S rRNA pyrosequencing 解析に供した。カンピロバクター分離陰性となった C・F 農場由来検体と、同陽性を示した D・E 農場間にて構成比率に有意差を認める菌属を探索したところ、*Bacteroides* 属が両群間で有意差を示し、C・F 農場由来検体では、16.7% - 18.5%の構成比率であったのに対し、D・E 農場由来検体における上記属菌の構成比率は 4.0 - 5.7%に留まった。

以上の成績より、*Bacteroides* 属がカンピロバクター分離培養成績と一定の相関性を示すことが明らかとなった。

3) カンピロバクター陰性農場 (C 農場) における鶏盲腸便構成菌叢の経時挙動

カンピロバクター陰性を示した C 農場の特定鶏舎で飼養される肉用鶏より、18 日齢、28 日齢、32 日齢および 46 日齢時に盲腸便を採材し、分離培養に供すると共に、各日齢の検体より 3 検体を無作為に抽出し、菌叢解析に供した。結果として、最も優勢であったものは *Bacteroides* 属であった他、日齢に応じて構成比率を増加させた菌属としては、*Sporobacter* 属が、対して *Flavonifractor* 属、*Oscillibacter* 属、*Escherichia* 属等の構成比率は経時的に減少する菌属として同定された。

以上より、カンピロバクター陰性を示した C 農場で飼養される鶏群については、飼養期間を通じて、*Bacteroides* 属が優勢盲腸菌叢として存在することが明らかとなった。

2 .食鳥処理場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 鶏内臓摘出処理機器メーカーへの聞き取り調査

我が国の食鳥検査制度は平成 4 年から始まっており、その検査制度に合わせて今の食鳥処理機器が普及した。食鳥検査開始から 24 年間がすぎた今日、多くの処理機器が更新をすませており、以前は 1 社単独の処理機器メーカー製品を導入する施設が多かった状況は、複数のメーカー機器が処理工程ご

とに設置されるように変遷した。今日の処理技術の向上はめざましく、作業の効率化と衛生対策が施されていた。内臓摘出機においては内臓摘出時の腸破損による、と体への腸内容物の汚染も極めて少なくなるような技術が導入されていた。処理鶏の大きさが均一であれば、内臓摘出時の腸の破損がほぼ無い処理も可能であった。

フィリピンは国際獣疫事務局(OIE)より高病原性鳥インフルエンザや口蹄疫の発生の無い国として認められているため、鶏肉や豚肉は輸出することができる。訪問したフィリピン・ルソン島の食鳥処理場は日本では導入の無いBAYLE社(フランス)製1社単独の処理機であった。海外輸出が可能な食鳥処理場でありフィリピンの食肉検査センター(National Meat Inspection Center: NMIS)の食鳥検査およびHACCPが導入されていた。内臓摘出装置およびその他の処理機器・施設を写真として示した。

2) エアーチラー設置食鳥処理場の聞き取り調査等

エアーチラーは平成4年の食鳥検査導入にあわせて建て替えをした時に設置していた。中抜きと体を手作業で60ppm以上(80-100ppm)の塩素消毒水槽に一度浸し、それを懸垂フックに懸垂し約0の冷蔵庫内で約90分間維持していた。特徴は一羽一羽を個々に空気で冷却することによって、鶏肉が水を吸収しないため、ドリップがでないことである。よって、中抜きと体の歩留りは若干減少することであった。

現在、内臓摘出時による腸管の損傷の防止、エアーチラー投入前の塩素水による消毒、エアーチラー等によるカンピロバクター汚染の少ない鶏肉の生産を試みている。カンピロバクター汚染を軽減できるよう努力しているが、生食ができる鶏肉を生産しているのではないので、加熱をして喫食してほしい、とのことであった。

3. 加工・流通段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 急速液体冷凍及び緩慢冷凍に伴う鶏モモ肉温度

変化の比較

急速液体冷凍および緩慢冷凍に伴う、鶏モモ肉25g中の温度変化を比較した。急速液体冷凍に伴う検体中心温度は、4.8 から190秒後には-20に、6分後には-30に到達した。一方、空冷式冷凍庫を用いた緩慢冷凍処理を行った際の検体中心温度は4.8 から102分後に漸く20に到達する等、前者は後者に比べ速やかな検体温度低下を導くことが示された。

2) 急速液体冷凍・緩慢冷凍処理に伴う鶏モモ肉中カンピロバクターの生存菌数の比較

急速液体冷凍処理および緩慢冷凍処理を通じた、鶏モモ肉中におけるカンピロバクター・ジェジュニ計5株の生存挙動を添加回収試験により検討した。7.25 7.54対数個/gの各菌株を接種した、急速液体冷凍処理群(-35)を3, 6, 24, 48時間行った後の接種菌生存数は、それぞれ5.05-6.43対数個/g、5.05-6.43対数個/g、3.74-6.09対数個/g、3.73-6.06対数個/gとなり、各時間帯における検体1gあたりの菌数低減値は、1.10-2.19対数個、1.46-2.70対数個、1.01-3.51対数個、1.47-3.52対数個となった。これに対し、緩慢冷凍処理を3, 6, 24, 48時間実施した後の生存菌数は、それぞれ6.27-7.16対数個/g、4.87-6.80対数個/g、3.93-6.49対数個/g、4.08-5.99対数個/gとなり、各時間における検体1gあたりの菌数低減値は、0.41-1.20対数個、0.88-2.60対数個、1.08-3.54対数個、1.69-3.38対数個となった。

両群間の成績比較を通じ、緩慢冷凍処理群に比べて、急速液体冷凍処理群の有意な菌数低減は、3時間処理時でのみ認められ、6時間以上処理した場合には認められなかった。

3) 急速液体冷凍処理による自然汚染丸鶏でのカンピロバクター汚染菌数の低減効果

急速液体冷凍処理による効果については迅速な汚染低減効果が部分肉を用いて検証されたが、丸鶏における汚染低減への適用性について検討する目的で、1羽あたり平均2,094MPN値の本菌自然汚染を

顕す丸鶏を用いて、3時間の急速液体冷凍処理を行った場合の汚染低減効果を評価した。結果として、同処理を行った丸鶏検体での平均汚染菌数は404 MPN 値へと低減を示した ($p = 0.13$)。

4) クラストフリージング処理による、食鳥部分肉中のカンピロバクター自然汚染低減効果の検証

A 施設では、食鳥処理直後に、クラスト冷凍処理により、表面を急速冷凍させた(クラスト冷凍処理群)、またはチルド(10°C 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、B 施設においては、同様の処理を行った際の食鳥モモ肉(骨付き)について、カンピロバクター及び衛生指標菌(A 施設検体では、一般生菌数・大腸菌群数・腸内細菌科菌群数、B 施設については、一般生菌数及び腸内細菌科菌群数)の定量試験を行った。

(i) A 施設

カンピロバクター検出菌数として、チルド処理群では、ムネ及びササミ検体ではそれぞれ 0.68 MPN count/g 及び 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。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、モモ及びレバーにおける菌数は 11.00 MPN count/g 及び 3.10 MPN count/g であった。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。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、ササミ及び砂肝の菌数は低い値であった。大腸菌群数については、チルド処理群が 2.80-4.51 対数個/g (平均値 3.79 対数個/g)、クラストフリージング処理群では 1.92-4.43 対数個/g (平均値 3.14 対数個/g)、腸内細菌科菌群数については、チルド処理群が 2.34-4.36 対数個/g (平均値 3.59 対数個/g)、クラストフリージング処理群が 2.08-4.30 対数個/g (平均値 3.01 対数個/g)を示した。一般生菌数と同様

に、大腸菌群数及び腸内細菌科菌群数として最も高値を示した部位はモモであり、最も低値を示した部位はササミであった。クラストフリージング処理群・チルド処理群間で、指標菌数に有意差を認めた部位は砂肝のみであった。指標菌の別では、腸内細菌科菌群数は他の指標菌に比べ、冷凍処理による低減効果が低い傾向にあった。

(ii) B 施設

当該施設で加工された食鳥モモ肉検体におけるカンピロバクター自然汚染平均菌数は、チルド処理群で 0.646 MPN count/g、クラスト冷凍処理群で 0.080 MPN count/g となり、後者で有意に低い菌数が認められた。指標菌については、両群間での有意差は認められず、生菌数(平均値)については、チルド処理群で 4.46 対数個/g、クラストフリージング処理群で 4.23 対数個/g、腸内細菌科菌群数(平均値)については、チルド処理群で 4.46 対数個/g、クラスト冷凍処理群で 4.23 対数個/g となった。

以上より、クラスト冷凍処理による鶏肉中の自然汚染カンピロバクター菌数に係る低減効果を定量的に示すことができた。一方で、腸内細菌科菌群をはじめとする、食肉製品の衛生指標菌の冷凍処理を通じた鶏肉中での生存挙動成績から、これらの指標菌は同処理を通じたカンピロバクター低減効果を図る指標とはなりえないことが示された。

4. 流通・消費段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

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。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

1. 農場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

本研究では、出荷時齢鶏盲腸便を対象として、カンピロバクター保菌状況を検討し、当該菌の汚染の有無を農場単位で把握した。その上で、各検体の構成菌叢の解析を通じ、カンピロバクター保菌と関連性を示す菌叢の探索を行い、*Bacteroides*属の構成比とカンピロバクター分離成績との間で関連性を見出した。

カンピロバクターが顕す鶏腸管定着は、概ね3-4週齢以降に生じるとされる。同時期はいわゆる換羽期に相当するため、免疫機構の大幅な変動が予想される他、菌叢にも多大な影響が生じると目される。しかしながら、これらに関する根拠は未だ明らかとなっていない。養鶏農場では、通常、餌付け・前期・後期・仕上げ飼料の4種を日齢に応じて給餌する形態をとっているが、仕上げ飼料には休薬期間を設ける必要があることから、抗生物質が含まれていない。本研究での協力農場についても、A農場の一部鶏群を除き、同様の飼養管理が行われていた。同農場内での無薬鶏群におけるカンピロバクター分離陽性率は有薬鶏群に比べて高い結果となっていたが、このことは、抗生物質の飼料添加が、カンピロバクターの鶏腸管定着に一定の制御効果を示しうること

を示唆しており、これまでの複数の研究結果を支持するものといえる。供試農場間での分離成績の差異についても、使用する抗生物質の種類・頻度・投与量等が影響する可能性も考えられるが、A・B農場で飼養される鶏群、あるいは関東地方のD-G農場で飼養される鶏群については、それぞれ統一した飼養管理形態を取っていることから、他の要因が関連する可能性を否定することはできない。

鶏盲腸内には、他の動物宿主と同様に、多様な細菌から成る菌叢が構成され、宿主免疫機能にも影響を及ぼすことが明らかになりつつある。これら菌叢変動を招く要因として、近年では、飼料中の硫酸水素ナトリウム含有量が挙げられている。供試検体における構成菌叢は、農場間で大きく異なっていたが、その中に於いて、*Bacteroides*属はカンピロバクター保菌状況と統計学的関連性を示すことを見出した点は興味深い。本属菌は、これまでに92種・5亜種が知られている。鶏由来 *Bacteroides* 属の遺伝特性の多くはこれまで不明であったが、本年に入り、*B. barnesiae* のゲノム配列が決定される等、その知見も集積されつつある。鶏腸管における主要菌叢については、従前より報告されているが、カンピロバクター保菌との関連性に着目した方向性でこうした菌叢動態を検討しようとする研究はこれまで実施されていない。今後は、当該属菌株の特性を精査すると共に、鶏腸管におけるカンピロバクター定着抑制効果に関する検討を進めることで、生菌剤としての有効性評価へとつなげていきたい。

2. 食鳥処理場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 鶏内臓摘出処理機器メーカーへの聞き取り調査

現在、我が国の多くの食鳥処理場に導入されている機器は世界的に展開している大規模な処理機器メーカー製であること、一つの食鳥処理場に複数のメーカーの機器が導入されていることもあること、機器の技術はめざましく、食鳥検査制度を導入した平成4年当時より衛生的に良くなっていることが判明した。

衛生的な処理を保証するためには、処理される鶏の大きさが均一である必要があり、わが国のように飼育週令の異なる鶏を処理する場合は処理される鶏の大きさごとに処理機器を調整する必要がある。食鳥処理のオペレーターの技量によっても、処理されると体の衛生度が変わると思われた。

鶏肉を輸出することができるフィリピンでは輸出認定処理場には HACCP システムが導入されており、当然のことながら、国際基準の管理が実施されていた。もちろん、施設や一般的衛生管理も整っており、清潔な施設であった。

アジア諸国で口蹄疫と高病原性鳥インフルエンザの両方が無い国はフィリピンと我が国のみである。今後、フィリピン製の食肉も輸入される可能性もあると思われた。

2) エアーチラー設置食鳥処理場の聞き取り調査

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。今回訪問したエアーチラーシステムは、60ppm 以上(80-100ppm)の塩素水槽に一度浸した後約 0 のエアーチラー室内で 60 分間、中抜きと体をインラインで保持するものであることから、カンピロバクター汚染の軽減に寄与するものと思われた。

3. 加工・流通段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

本研究では、冷凍処理の実用的活用を考慮した上で、急速液体冷凍装置及びクラストフリージング装置を用いた鶏肉中でのカンピロバクター生存挙動に関する諸検討を行った。

これまでに集積されている主な知見として、数日間の緩慢冷凍では、0.91-1.44 対数個の減少が、3

週間の緩慢冷凍では、1.77-2.18 対数個の減少を示すことが明らかにされており、本研究で実施した緩慢冷凍処理による鶏肉中での本菌生存挙動に関する成績は、これらを更に支持するものといえる。わが国で消費される鶏肉のおよそ 3 分の 1 は輸入品で占められるが、これらは緩慢冷凍処理後、船舶により冷凍状態で国内に輸送される。本菌汚染率について、輸入冷凍鶏肉と国産冷蔵鶏肉を比較した過去の研究では、前者が後者に比べて相対的に低い汚染率を示すことが報告されていることは、冷凍処理に伴う本菌制御効果を更に支持するものといえよう。しかしながら、こうした緩慢冷凍処理は鶏肉の品質低下を招くことも懸念されるため、国内で生産される鶏肉に対する現実的な応用制御策として導入することは困難とも思われた。そこで、本研究では、国内での馬肉の流通にあたって、品質保持も含めた形で、馬肉の流通段階における応用手法として実用化されている、急速液体冷凍処理による本菌汚染の低減効果を検討することとした。同冷凍処理による低減効果は、緩慢冷凍に比べて、より速やかに低減することが示され、短時間処理によっても一定の制御効果があると目された。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では、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。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。本菌におけるバイオフィーム形成は、他菌と同様に、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、今後の検討課題と考えられる。

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。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。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ることから、加工・流通段階における本菌汚染低減策の一つとして今後の応用が期待される。

4. 流通・消費段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

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。

E. 結論

1. 農場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

出荷時齢の鶏盲腸便を対象とした、カンピロバクター分離試験成績と、*Bacteroides*属の構成比には一定の相関が認められた。本研究の成績より、構成菌叢の管理を通じた、カンピロバクターの鶏生体における制御が期待される。

2. 食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

我が国に導入されている食鳥処理機器の多くは世界に流通網を有するメーカー製であり、条件があれば世界レベルの衛生度を保有できる機器であると思われた。エアーチラーはと体のカンピロバクター汚染を軽減する効果があると推定されたが、科学的に証明されていない。今後、微生物学的検査を実施し、その効果を科学的に証明する必要があると思われる。

3. 加工・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

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、加工・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。

4. 流通・消費段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

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または湯引きによる低減効果の検証が必要と考えられる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 書籍

該当無し

2. 論文

- 1) 朝倉宏、山本詩織、橘理人、吉村昌徳、山本茂貴、五十君静信。(2015) 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) Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. (2016) Ex vivo proteomics of *Campylobacter jejuni* 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. Res Microbiol. 167: 63-71.

3. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 木村浩紀、蓮沼愛弓、山谷郁子、朝倉宏、村上覚史. 鶏盲腸内での時系列的 *Campylobacter jejuni* の定着動態と盲腸菌叢変動要因の探索に関する検討. 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)

- 3) 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)
- 4) 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)

H. 知的財産権取得状況

該当なし