

平成28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研究を行なった。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、各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)生産段階では国内3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上で、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があることを前年度に引き続き検証し、これを確認した。その上で、カンピロバクター陰性検体より*Bacteroides*属菌の単離を行い、得られた株がカンピロバクターの生存増殖を抑制する作用を示すことを共培養試験を通じて明らかにした。*Bacteroides*分離株由来抽出物についても同様の静菌作用を示したことを受け、来年度には農場での生体を用いた実証試験を行い、その有効性を評価したい。(2)食鳥処理段階では、外剥ぎ方式の処理を受けた鶏肉の汚染実態が一般的な中抜き方式で処理された鶏肉に比べて低いことを示した。また、九州地方の生食用鶏肉の処理工程を視察し、ブロイラー鶏ではなく、廃鶏が主な対象であること、表面焼烙が実施されている実態を把握した。ニュージーランドの食鳥処理施設を視察すると共に、当該国の規制当局担当者らと意見情報交換を行い、当該国でのカンピロバクター食中毒低減に効果的であった工程・手法として、殺菌剤の断続的シャワーリングおよびチラー槽内の複合的管理体制の充実であることを把握した。(3)加工・流通段階では、鶏肉表面へのカンピロバクター添加試験を通じ、当該菌が鶏肉内部へ浸潤性を示すことを定量的に評価した。また、表面加熱手法の一つである温浴加熱によって全体での汚染菌数は低減するものの、本菌は内部浸潤を示すため、一定数生残することを明らかにした。(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を加熱用鶏肉と定量比較し、前者の汚染菌数は相対的に低い実態を把握した。また、一部の生食用鶏肉検体では高度の汚染も見受けられたが、これらは一部の施設に限定的であることを製造者をトレースすることにより明らかにした。

## 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 共同獣医学部)  
\* 平成 28 年 12 月まで

## 研究協力者

五十君 静信 東京農業大学  
猪子 理絵 北海道帯広食肉衛生検査所  
鹿島 正文 鹿児島県保健福祉部生活衛生課  
川瀬 遵 島根県食肉衛生検査所  
川本 恵子 帯広畜産大学  
窪田 邦宏 国立医薬品食品衛生研究所  
熊谷 優子 国立感染症研究所  
倉園 久生 帯広畜産大学  
小西 良子 麻布大学  
坂田 淳子 大阪府立公衆衛生研究所  
品川 邦汎 岩手大学  
橘 理人 岡山大学  
茶園 明 日本食品安全検証機構  
盆下 誌保 東京家政大学  
中村 寛海 大阪市立環境科学研究所  
藤田 雅弘 群馬県衛生環境研究所  
梶田 和彌 国立医薬品食品衛生研究所  
村上 覚史 東京農業大学  
森 篤志 日本冷凍食品検査協会  
山本 詩織 国立医薬品食品衛生研究所  
渡辺 邦雄 日本食品安全検証機構  
渡邊 真弘 日本冷凍食品検査協会

(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、各段階に応じた研究目的等を記す。

#### (1) 農場段階

鶏をはじめとする家禽類については、農場への導入時にあたる幼雛期には本菌陰性であるが、2-3週齢の間に本菌の定着を生じ、以後少なくとも9週間は定着し続けることが明らかになっている。国内に流通する鶏肉の多くは50日齢程度のブロイラー鶏由来であり、本菌による汚染を一旦受けた農場で飼育された鶏群は高率に本菌を保菌している傾向が高い。また、本菌による鶏肉汚染は、食鳥処理工程での交叉汚染が主な要因と目されているが、そもそも生産段階における本菌制御が確立すれば、カンピロバクター食中毒の低減をはかるにあたって、より根源的な対策を立てることが可能となるため、農場段階における本菌制御策の構築は必要不可欠な課題の一つといえる。

鶏生体における本菌の汚染(定着)への対策としては、これまでも乳酸菌やバシラス属菌等、いわゆる生菌剤(プロバイオティクス)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。より近年では、こうしたプロバイオティクス効果を裏付ける要因として、乳酸菌の菌体表層タンパク分子あるいは有機酸代謝能といった分子や代謝機構が、カンピロバクターの鶏腸管定着抑制を支える分子基盤として明らかにされつつあるが、それらの多くは依然として不明である。養鶏場での本菌制御策は、世界的な課題として、現在も解決されていないが、一般的に知られる上述のプロバイオティクス細菌以外にも、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、種々の腸内菌叢が報告されており、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、出荷時齢のブロイラー鶏を対象として、昨年度に検討対象とした7

養鶏農場のうち、本菌陽性または陰性であることが確認された計3農場を対象に、本年度も出荷時齢鶏盲腸便のカンピロバクター検出状況及び構成菌叢を継続的に検証した。その中で出荷時にカンピロバクター陰性であることが示された1農場由来検体よりカンピロバクター保菌との関連性が示唆された*Bacteroides*属菌の分離を行い、試験管内における*C. jejuni*生存増殖への影響について検討を行ったので、報告する。

#### (2) 食鳥処理段階

鶏が農場に導入された時点の初生雛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。

我が国の食鳥処理場では内臓をと体から抜き取り、内臓検査とと体検査を同時に実施する中抜方式が主流であり、外剥方式は極めて少数である。外剥方式は内臓を傷つけることなく、最初鶏肉をはぎ取ることから、衛生的な処理と推定される。しかしながら、外剥ぎ方式で処理された食鳥肉の衛生状況については十分な知見が得られていない。以上のことから、本年度は外剥方式の食鳥処理場製品およびスーパーマーケット等で市販されている製品について細菌学的な比較を実施したので報告する。

あわせて、海外諸国の中で、2007-2010年の間にカンピロバクター食中毒発生数の減少に成功しているニュージーランドの規制当局担当者や政府関連研究機関の研究責任者と当該国最大手の食鳥処理施設を視察し、本食中毒低減に資する対策と今後の課題等について意見・情報交換を行った。

#### (3) 加工・流通段階

カンピロバクター食中毒は国内外を問わず、細菌性食中毒の中で最も発生頻度が高く、発生低減が社会的に求められている。厚生労働省が取り纏めてい

る食中毒統計資料(食中毒発生動向に関する統計資料)によると、2015年に発生した本食中毒発生件数は計318件、患者数は2,089人にのぼっており、同年の食中毒事件総数1,202件の約26.5%、細菌性食中毒事例総数の約73.8%を占めている。食中毒報告数が発生案件の一部に限られるとする疫学的見解を踏まえると、実際の本食中毒発生数は更に多いものと考えられる。

国内で発生した本食中毒事例のうち、原因食品が特定・推定された過去10年間の国内食中毒事例は628件あり、そのうち482件(76.8%)は鶏肉によるものとなっている。更に、鶏肉を原因食品とする事例のうち、非加熱食品(刺身やタタキ等)による発生件数・発生率は、306件・48.7%となっており、加熱不十分あるいは非加熱の鶏肉の調理・提供・喫食等について十分に留意すべきことは周知のとおりである。一方で、我が国では、鶏肉の生食に関する食習慣があることを踏まえ、当該製品における汚染低減対策についても考慮する必要があると考えられる。こうした背景を鑑み、本研究では、鶏肉の流通にあたっての制御対策として、表面加熱を行った際のカンピロバクター生残性、ならびに当該菌の鶏肉内部への浸潤性等に関する検討を行ったので報告する。

#### (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。

前年度には、半定量的な手法を用いて、鹿児島県内の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加熱用鶏肉製品と併せて比較推定した。本年度は、定量的汚染実態を精査する目的で、検体数を拡充すると共に、より精密な試験法を用いて比較検討を行い、当該地域にて流通・消費される生食用鶏肉の本菌汚染状況に関する知見の集積と今後期待される加工段階等での対策について考察を行うこととした。

## 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) 検体

平成28年10月～12月の間に、九州地方にあるA/B農場および北海道・東北地方のC農場において飼養され、出荷時齢にある肉用鶏盲腸便をシードスワブ(ニッスイ)を用いて採材した。採材検体は速やかに冷蔵温度帯で研究室に輸送し、カンピロバクター定性検出試験に供した。また、A及びB農場については、当該鶏舎より出荷され、解体処理を受けたモモ肉についても各5検体ずつ採材し、カンピロバクター定量検出試験に供した。

#### 2) 分離培養試験(定性)

上記シードスワブより取り出した盲腸便検体は計量後、速やかに1mLの滅菌リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)に懸濁した。うち0.5mLについては、10mLのプレストン培地(ニッセイバイオ)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、代表的発育集落を5つ釣菌し、継代培養を行った後、生化学性状試験及びPCR法による菌種同定を行うことで、陽性・陰性の判定を行った。

#### 3) DNA抽出

2.で調整した懸濁溶液残液約0.5mLより、Cica Genious Total DNA prep kit(関東化学)を用いて、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) 菌叢解析

盲腸便スワブ懸濁液より抽出した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。取得配列データより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 プログラムを用い、階層解析等を行った。

#### 5) *Bacteroides* 属菌の分離

C農場由来盲腸便検体より、Duerden の方法に従い、*Bacteroides* 属菌の分離を行った。得られた分離株については、16S rRNA 部分配列解析データをもとに、NCBI Blastn 検索を通じて、菌種同定を行い、-80 °Cにて保存した。

#### 6) *C. jejuni*/*B. fragilis* 共培養試験

約 $10^4$ CFUの*C. jejuni* NCTC 11168株を10mLのMueller-Hinton brothまたはBHIS brothに懸濁した後、同菌数の*B. fragilis* an-3株、an-51株、JCM xxxx株をそれぞれ添加し、微好気または嫌気条件下にて培養した。24時間毎に各培養液を採取し、Mueller-Hinton 寒天培地およびBHIS 寒天培地に接種後、それぞれ微好気または嫌気条件下にて培養し、発育集落数を求めた。

#### 7) *C. jejuni* 生存増殖に対する *B. fragilis* 抽出物の制御効果検証試験

約 $10^4$ CFUの*C. jejuni* NCTC 11168株を10mLのMueller-Hinton brothまたはBHIS brothに懸濁した後、*B. fragilis* an-51株由来菌体破砕抽出物をタンパク最終濃度として、0、1、5、10、20、30 $\mu$ g/mLとなるよう添加し、微好気及び嫌気条件下でそれぞれ培養を行った。培養24、48、72時間後の培養液濁度を600nmの波長で測定し、*C. jejuni*の生存増殖性を経時的に測定した。

また、上述の*B. fragilis* an-51株由来菌体破砕抽出物(30 $\mu$ g/mL)に対して、Proteinase K

(Promega) 100 $\mu$ g/mLあるいはBensonase 25 unit/mL(タカラバイオ)を用いて前処理した後、約 $10^4$ CFUの*C. jejuni* NCTC 11168株を10mLのMueller-Hinton brothまたはBHIS brothに懸濁し、当該菌の生存増殖性について、同様に、濁度計を用いて測定した。

#### 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) 外剥方式処理場製品と一般市販製品の比較

2017年2月に外剥方式処理場を訪問し、ムネ、モモ、ササミ2検体ずつ計6検体を購入した。2016年5月および10月にスーパーマーケット10店舗からムネ、モモ、ササミを10検体ずつ購入した。

検査項目は一般生菌、大腸菌群、大腸菌、カンピロバクター、サルモネラとした。

一般生菌数、大腸菌群数、大腸菌数：検体10gを90mLの滅菌PBSの入った滅菌ストマック袋に加え、ストマッカー処理を1分間実施した。その後、滅菌PBSで適宜希釈し、その希釈液を標準寒天培地(日水：一般生菌数測定)、XMG寒天培地(日水：大腸菌群数、大腸菌数)に塗布し、 $36\pm 1$  °Cで、定められた培養時間、好気培養を実施した。培養後、平板上に発育した(典型的な)集落をカウントし菌数を算出した。

カンピロバクター数：検体25gを225mLのNutrient broth No.2(Oxoid)の入った滅菌ストマック袋に加え、ストマッカー処理を1分間実施した。その希釈10mL、1mL、100 $\mu$ Lをそれぞれ100mLのプレストン培地に3本ずつ接種し、42 °Cで48時間、微好気培養を実施した。その後、培養液1白金耳量をCCDA寒天培地(SEL)(Oxoid)に接種し、42 °Cで48時間、微好気培養した。発育集落のうち、典型集落を3つ釣菌し、カンピロバクターの確認試験に供し、最確数法換算表を参照し、各検体の菌数を求めた。なお、カンピロバクター・ジェジュニ/コリであることが確認できた集落が1つ以上あった場合、その検体は陽性とした。

サルモネラ数：検体25gを225mLのNutrient broth No.2(Oxoid)の入った滅菌ストマック袋に

加え、ストマッカー処理を 1 分間実施した。その希釈 10mL, 1mL, 100 $\mu$ L をそれぞれ 100mL の RV 培地( Oxoid )に 3 本ずつ接種し、42 で 24 時間、好気培養を実施した。その後、培養液 1 白金耳量を DHL 寒天培地( 日水 )とプリリアンスサルモネラ( サーモフィッシャー )に接種し、37 で 12 時間、好気培養した。発育集落のうち、典型集落を 3 つ釣菌し、サルモネラの確認試験に供し、最確数法換算表を参照し、各検体の菌数を求めた。なお、サルモネラであることが確認できた集落が 1 つ以上あった場合、その検体は陽性とした。

## 2) 鶏肉製品の細菌検査

上記と同一の食鳥処理場より出荷され、スーパーマーケットで小分け・市販されてた鶏モモ肉製品 10 検体をカンピロバクター検査を供した。検査法は前述のカンピロバクターの検出方法で実施した。また、うち 5 検体については一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数等の衛生指標菌の定量試験に供した。

## 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 ) 鶏肉検体

都内で市販される、国産鶏モモ及びムネ肉を入手し、冷蔵温度帯で当所へ搬入し、速やかに試験に供した。当該検体は販売施設により、整形が施され、1 検体あたりの重量は約 400g、大きさは平均値として、14.2cm x 13.2 cm x 2.8 cm であった。

### 2 ) 鶏肉内部浸潤性試験

カナマイシン耐性を示す *C. jejuni* ヒト臨床分離株をミュラーヒントン寒天培地( MHA )を用いて 16 時間、37 にて微好気培養を行った。約  $4.0 \times 10^6$ CFU/mL となるよう調整した当該菌液を鶏肉検体表面全体に塗布し、4 にて 1 時間保存した。その後、検体を取り出し、鶏肉検体表面をスワブでふき取り、10ml の PBS で十分に懸濁したものを表面汚染試料とした。次に、深部から順に、表面下 15-20mm, 10-15mm, 5-10mm, 0-5mm の切片( 各 3cm x 3cm x 0.5cm の肉塊 )として切り出し、10ml の緩衝ペプトン水に懸濁した。菌数

測定には最確数( Most Probable Number, MPN )法を用いて、各懸濁溶液 1ml, 100 $\mu$ l, 10 $\mu$ l を 10ml の Preston 培地に接種し、42 で 48 時間培養した後、PCR 法により、*C. jejuni* 遺伝子の検出状況を確認した。PCR 陽性反応を示す検体については、それぞれ mCCDA 寒天培地に接種し、定型的集落の有無を確認すると共に、定型的集落について PCR 法による確認試験を行うことで、菌数を測定した。

### 3) 温浴加熱による汚染低減効果の検証

異なるロットながら、同一の経路で入手した同等の鶏モモ肉およびムネ肉検体の表面に *C. jejuni* 株を塗布し、4 にて 1 時間保存した。これを耐熱性包装を用いて、脱気密封した後、85 の温浴槽内にて一定時間( 0, 1, 2, 3, 5, 10 分間 )加熱した。加熱後は速やかに氷水中において急速冷却させ、滅菌鉢を用いて細切した後、3600mL のプレストン培地を加え、1 分間ストマッキング処理を行い、検体懸濁液を調整した。同液および 10 倍階段希釈液を作成し、100 $\mu$ L ずつ mCCDA 寒天培地に接種した。42 にて 48 時間微好気培養した後、発育集落数を求め、定型的集落 5 つを釣菌し、PCR 法による確定試験に供することで、生存菌数を求めた。各加熱時間軸におけるサンプル数は N=5 とした。

### 4) 温浴加熱を通じた鶏肉内部でのカンピロバクター生存性に関する検証試験

上項 3.と同様に鶏肉検体を温浴加熱に供し、冷却後の鶏肉検体について、別項 2.と同様に、表面および表面下 5mm 幅での内部検体を調整した。それぞれの回収検体を 10mL のプレストン培地に接種し、42 で 48 時間微好気培養後、同培養液を PCR 法に供し、カンピロバクター生存性に関する定性検出成績を得た。

### 5) 市販鶏刺し製品におけるカンピロバクター定性検出試験

大手インターネットサイトを通じて、購入可能であった冷凍出荷の鶏刺し製品計 24 製品( 各 3 検体、計 72 検体 )を 4 にて解凍させた後、25g を採材し、225mL のプレストン培地に接種し、42 にて 48 時間微好気培養した。同培養液 1 白金耳を m

CCDA 寒天培地に接種し、更に 42℃にて 48 時間  
微好気培養した。定型的集落が認められたものにつ  
いては、PCR 法を用いた確定試験に供し、カンピ  
ロバクターの定性判定を行った。

#### 4 .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

##### 1) .検体

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 6 1 検体、加熱用鶏肉 4 6 検体の計 1 0  
7 検体とした。何れの検体についても、購入日のう  
ちに、試験に供した。購入鶏肉製品については、購  
入・加工年月日、製品名、販売事業者名、加工事業  
者名等の情報を製品表示を根拠として記録した。加  
工事業者の規模はさまざまであり、計 1 0 事業者由  
来の検体を得ることができた。

##### 2) MPN 法 (最確数法)

MPN 3 本法を用いカンピロバクターの汚染菌数  
を推定定量した。試験法の概要は図 1 に記す。まず、  
鶏肉 50g 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。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、さらに 1 ml、0.1ml をそれぞれ 10ml プ  
レストン液体培地入り試験管に接種し、これらを  
42℃の微好気条件下にて 48 時間培養した。培養後  
は、培養液 1 白金耳を mCCDA 培地上に塗抹し、  
再び 42℃の微好気条件下にて 48 時間培養を行っ  
た。mCCDA 培地上でカンピロバクター様の定型集  
落が認められたものについては、位相差顕微鏡を用  
いた菌体形態の観察、ならびに *C. jejuni*、*C. coli*  
同定のための PCR を行い、陽性・陰性の判定を行  
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) 農場の汚染状況

計 3 農場 (A・B 農場については 4 鶏舎由来、C  
農場については 2 鶏舎由来)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。昨年度と同様、C 農場由来検体 (計  
60 検体) は全て陰性であったが、A・B 農場由来  
検体は、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%))、13 検  
体 (65%) が陽性を示した。また、分離株につい  
ては、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) 鶏盲腸便構成菌叢の比較解析

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、A~C 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  
農場由来検体と、同陽性を示した A・B 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 農場由  
来検体では、平均 16.7%の構成比率であったのに  
対し、A・B 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。以上より、年度に  
因らず *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改めて実証さ  
れた。

##### 3) カンピロバクターに対する鶏盲腸便由来 *B.* *fragilis* 株の制御効果

カンピロバクター陰性を示した C 農場由来鶏盲  
腸便検体より、*B. fragilis* an-3 株および an-51 株  
を分離した。当該株ならびに標準株である  
JCM11019 株を hemin および Vitamin K を含む  
BHI ブロス中にて嫌気培養した後、並行して培養し  
た *C. jejuni* NCTC 11168 株をそれぞれ約  $10^4$  CFU  
となるよう、MH ブロスあるいは BHI ブロス中に  
懸濁し、微好気および嫌気条件下にて生菌数の挙動  
を経過観察した。

結果として、菌株及び大気条件に因らず、*B.*  
*fragilis* は何れも試験管内における *C. jejuni* の生  
存・増殖を経時的に減少させた。

##### 4) カンピロバクターの生存増殖に対する *B.*

## *fragilis* 抽出物の制御効果

異なるタンパク濃度の *B. fragilis* 菌体破碎抽出物を約  $10^4$  CFU の *C. jejuni* NCTC11168 株を含む液体培地中に添加し、後者の生存増殖性を経時的に観察したところ、濃度依存的に本抽出物は *C. jejuni* の増殖を低減させることが明らかとなった。本抽出物を Proteinase K を用いて前処理を行った場合、*C. jejuni* の生存増殖に対する制御効果は、無処理投与群に比べ、大きく低減した。

以上の成績より、*C. jejuni* の生存増殖に対して顕れる *B. fragilis* の制御効果はタンパク性因子によるものと推察された。

## 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) 外剥方式処理場製品と一般市販製品の比較

#### i) 一般生菌数

ムネ：外剥方式の食鳥処理場（以下「処理場」）製品からは 2 検体中 2 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $4.19 \pm 0.15$  であった。スーパーマーケット等で市販されている（以下「市販」）製品からは 10 検体中 10 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $4.73 \pm 0.49$  であった。t 検定の結果、危険率 2% 未満で有意差があった。

モモ：処理場製品からは 2 検体中 2 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $4.37 \pm 0.25$  であった。市販製品からは 10 検体中 10 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $4.83 \pm 0.52$  であった。

ササミ：処理場製品からは 2 検体中 2 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $3.01 \pm 0.09$  であった。市販製品からは 10 検体中 10 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $4.97 \pm 0.88$  であった。t 検定の結果、危険率 1% 未満で有意差があった。

#### ii) 大腸菌群数

ムネ：外剥方式の処理場製品からは 2 検体中 2 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $3.58 \pm 0.22$  であった。市販製品からは 10 検体中 10 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $3.24 \pm 0.69$  であった。

モモ：処理場製品からは 2 検体中 2 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $4.00 \pm 0.54$  であった。市販製品からは 10 検体中 10 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $3.35 \pm 0.85$  であった。

ササミ：処理場製品からは 2 検体ともに未検出であった。市販製品からは 10 検体中 10 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $4.08 \pm 1.24$  であった。

iii) 大腸菌数

#### iii) 大腸菌数

ムネ：外剥方式の処理場製品からは 2 検体中 1 検体検出され、1g あたりの対数値は 2.30 であった。ムネの市販製品からは 10 検体中 5 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $2.56 \pm 0.75$  であった。

モモ：処理場製品からは 2 検体中 1 検体検出され、1g あたりの対数値は 2.77 であった。モモの市販製品からは 10 検体中 4 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $3.03 \pm 0.76$  であった。

ササミ：処理場製品からは 2 検体ともに未検出であった。ササミの市販製品からは 10 検体中 5 検体検出され、1g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $2.43 \pm 0.56$  であった。

#### iv) カンピロバクター

ムネ：外剥方式の処理場製品からは 2 検体ともに未検出であった。市販製品からは 10 検体中 5 検体検出され、100g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $2.78 \pm 1.16$  であった。

モモ：処理場製品からは 2 検体中 2 検体検出され、100g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $2.50 \pm 0.19$  であった。モモの市販製品からは 10 検体中 7 検体検出され、100g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $3.40 \pm 0.52$  であった。t 検定の結果、危険率 3% 未満で有意差があった。

ササミ：処理場製品からは 2 検体ともに未検出



であった。ササミの市販製品からは 10 検体中 5 検体検出され、100g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $2.02 \pm 0.39$  であった。

#### v) サルモネラ

ムネ：外剥方式の処理場製品からは 2 検体ともに未検出であった。ムネの市販製品からは 10 検体中 4 検体検出され、100g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $1.89 \pm 0.66$  であった。

モモ：処理場製品からは 2 検体ともに未検出であった。モモの市販製品からは 10 検体中 2 検体検出され、100g あたりの平均の対数値±標準偏差は  $1.71 \pm 0.22$  であった。

ササミ：処理場製品(2 検体)、市販製品(10 検体)ともに未検出であった。

#### 2) 原料は外剥方式の食鳥処理場製の一般市販されている製品の細菌検査結果

外剥方式の食鳥処理場製であるがスーパーマーケットで小分け市販されている製品(モモ)を 10 検体購入し、カンピロバクター検査を実施したところ 7 検体からカンピロバクターが検出された。

### 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

#### 1) カンピロバクターの鶏肉内部浸潤性

国産鶏モモ肉及びムネ肉検体の表面に約  $10^6$ CFU のカンピロバクターを接種し、4 にて 1 時間保存した後の、検体内部からの接種菌検出状況を定量的に検討した。鶏ムネ肉検体においては、表面より 10mm 下部まで接種菌が概ね検出され、当該部分 1 g における平均検出菌数は、2.90 対数 CFU であった。一方、鶏モモ肉内部からの検出状況については、表面より 15mm 下部まで認められ、表面下 10-15mm 地点における平均検出菌数は、2.29 対数 CFU/g となり、ムネ肉検体に比べ、相対的に内部からの検出が高い傾向にあった。

#### 2) 温浴加熱を通じた鶏肉中カンピロバクターの汚染低減効果

生食用鶏肉製品として流通する製品では、鶏肉表面を焼烙あるいはボイル等の加熱処理を施してい

るものが見受けられることから、当該処理による汚染低減効果に関する知見を収集するため、実験的に安定性を担保しうる加熱手法として温浴加熱を用いて検討を行うこととした。約  $10^6$ CFU のカンピロバクターを平均 400 g 重量の鶏ムネ肉およびモモ肉検体表面に実験的接種した後、4 ・ 1 時間保存を経て、85 温浴中で加熱処理を行なった。結果として、ムネ肉検体 1 g あたりの検出菌数は、加熱 0 分後において 4.19 対数 CFU であったが、加熱 5 分後には 3.60 対数 CFU、10 分後には 2.68 対数 CFU へと約 1.51 対数 CFU の減少を示した。一方で、鶏モモ肉検体においては、加熱 0 分後には 4.16 対数 CFU、加熱 10 分後においても 3.42 対数 CFU と約 0.74 対数 CFU の低減に留まった。3) 温浴加熱を通じた、カンピロバクターの鶏肉内部における生残性

カンピロバクターを実験的に表面接種した鶏肉検体を 85 ・ 10 分間の温浴加熱処理に供し、冷却後、表面下領域からのカンピロバクター定性検出試験を試みた。鶏ムネ肉からの検出状況については、温浴加熱処理を経ずに行った内部浸潤性試験とほぼ同様に、表面より 10mm 下部までの地点より接種菌が検出された。一方、加熱後の鶏モモ肉検体からは、表面下 20mm 地点からも検出される成績となり、加熱の有無に因らず、供試検体については、部位別に内部浸潤性に差異が認められた。

#### 4) 市販冷凍鶏刺し製品におけるカンピロバクターの検出状況

供試した鶏刺し製品計 72 検体をカンピロバクター定性試験に供したが、全て陰性を示した。

### 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

MPN 法に基づく本菌汚染の定量成績として、鹿児島県内の小売店において購入した生食用鶏肉 61 検体のうち、菌数が 0 ~ 10MPN/50g だったものは 53 検体、 $10 \sim 10^2$ MPN/50g だったものは 5 検体、 $10^2$ MPN/50g を上回ったものは 3 検体であった。加熱用鶏肉 46 検体のうち、菌数が 0 ~ 10MPN/50g

だったものは 20 検体、 $10 \sim 10^2$ MPN/50g だったものは 12 検体、 $10^2$ MPN/50g を上回ったものは 14 検体であった。製品間の比較を通じ、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菌数は総じて低いことが明らかとなった。生食用鶏肉の加工業者ごとに比較検討をしたところ、 $10^2$ MPN/50g を上回る汚染のあった 3 検体は検体数の少ない業者に限定されていた。なお、多くの検体数を確保することができた加工事業者 A および B の製品については、汚染菌数が低い状況であった。

## 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、養鶏農場にて採材した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するとともに、当該菌の保菌状況と *Bacteroides* 属菌等の構成比との関連性を継続調査した。

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。本研究では、昨年度に引き続き、鶏盲腸菌叢の中で、カンピロバクター保菌とただし *Bacteroides* 属占有率についての関連性を検討し、対象農場における普遍性を明らかにした。

経時比較により、カンピロバクター陰性鶏群における当該属菌の占有率上昇は出荷時齢（7 週齢）において生じた一方、カンピロバクター陽性鶏群ではこうした上昇挙動が見られなかった事象から、*Bacteroides* 属菌の鶏腸管における占有率増加がカンピロバクター定着増殖抑制に寄与する可能性が示唆された。本研究では、こうした状況を踏まえ、*Bacteroides* 属分離株を用いて、カンピロバクターの生存増殖に対する制御効果を試験管内において検討し、実際にその効果を見出すことができた。実際に農場でのトライアルを行う上で、*Bacteroides* 属菌投与の方法としては、飼料への添加等が想定されるが *Bacteroides* 属菌体抽出物がカンピロバク

ター生存増殖に対する制御効果を示したことから考えて、その投与対象としては必ずしも生菌である必要性は少ないとも目される。来年度に向けては、本属菌の生菌あるいは抽出物投与による、鶏生体でのカンピロバクター保菌への制御効果を検討することで、農場での制御効果を顕す手法としての有効性を明らかにしたい。

### 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) 外剥方式の食鳥処理場製品と一般製品の比較

我が国の食鳥処理場では内臓をと体から抜きとり、内臓検査とと体検査を同時に実施する中抜方式が主流であり、外剥方式は極めて少数である。そこで、外剥方式で製造されている製品（処理場）と一般市販されている製品（市販）とを比較した。

##### 一般生菌数

ムネ、ササミで有意差がみとめられ、処理場製品は市販製品よりも菌数が少なかった。モモはほぼ同様な検出割合および菌数であった。

##### 大腸菌群数

ササミでは処理場製品は未検出で、市販製品は 10 検体中 10 検体検出（1g あたりの平均対数菌数  $4.08 \pm 1.24$ ）されており、ササミは処理場製品はきれいかもしれない。ムネとモモはほぼ同様な検出割合および菌数であった。

##### 大腸菌数

ササミでは処理場製品は未検出で、市販製品は 10 検体中 5 検体検出（1g あたりの平均対数菌数  $2.43 \pm 0.56$ ）されており、ササミは処理場製品はきれいかもしれない。ムネとモモはほぼ同様な検出割合および菌数であった。

##### カンピロバクター

市販製品からは高率（ムネ：5/10 検体、モモ：7/10 検体、ササミ：5/10、計 17/30 検体）に分離されている。処理場製品からも高率（モモ：2/2、計 2/6 検体）から分離された。製品へのカンピロバクター汚染は保菌鶏農場のロットの処理の有無によって左右されるが、処理場製品、市販製品とも

に高率にカンピロバクターが分離されているが、菌数は処理場の製品のほうが、市販製品よりも少ないかもしれない。

#### サルモネラ

市販製品からはカンピロバクターよりも低率(ムネ：4/10 検体、モモ：2/10 検体、ササミ：0/10、計 6/30 検体)であるが分離されている。今回の処理場製品からは分離されていない。製品へのサルモネラ汚染も保菌鶏農場のロットの処理の有無によって左右されるが、市販製品のササミはムネ、モモよりも検出率は少ないかもしれない。

#### 2) 原料は外剥方式の食鳥処理場製の一般市販されている製品の細菌検査結果

外剥方式の食鳥処理場製品であるがスーパーマーケットで小分け市販されている製品(モモ)は高率(7/10 検体)にカンピロバクターを保菌していた。前述のモモの検査結果を含めると12検体中9検体からカンピロバクターが分離されており、市販製品のモモ(7/10 検体)と同様な分離率であった。市販肉はスーパーマーケットのバックヤード等で小分等の処理をしていることもあるので、処理場の汚染を完全に反映をしているとは言えないが、外剥方式のモモは、市販モモと同様に高率にカンピロバクター汚染が存在していたので、取り扱いには注意が必要であると思われる。

#### 3. 加工・流通段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

本研究において出された成績は、こうした汚染リスクが想定される鶏肉の制御を検討する上では、単一手法のみによるリスク管理が困難であることを示している。今後更に有効性の高い手法が開発される可能性もあるが、フードチェーンを通じた複合的対策の構築と運用を進めることが、本食中毒発生との関連性が高い鶏肉の安全性確保を現実的なものとするために必要と考えられる。来年度に向けては、関連手法の検証を更に進めると共に、各手法が鶏肉の物性等、品質面に与える影響についても評価し、もってそれらの実効性に関して考察を行いたい。

#### 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

昨年度の研究結果から生食用鶏肉のカンピロバクター汚染レベルは、加熱用鶏肉よりも相対的に低いことが予想されたが、それらの汚染レベルを正確に判定するには至らなかった。そこで、本年度はMPN3本法を用いて正確な汚染実態の把握に努めた。結果として、生食用鳥肉の多くはカンピロバクター属菌陰性となった他、汚染が認められた製品検体の多くも低い汚染菌数である状況を把握することができた。

高度汚染検体を除いて、カンピロバクター陽性サンプルのMPN / 50g 値は29未満であった。これは、生食用として販売されている鶏肉が加熱用鶏肉とは異なる工程を経て製造加工されていると想定された。その一方、生食用鶏肉のうち、3検体については、240 MPN / 50g を超える高濃度のカンピロバクター汚染も認められ、これらについては喫食を介したヒトへの感染リスクも想定される。これら高濃度汚染検体は、2つの小規模加工事業者(F、G)により製造加工されたものであり、当該事業者の実施する製造加工方法に依存する可能性が考えられる。従って、本菌汚染低減に資するための製造加工方法の具体的な管理要件を定め、これを実践していくことが本菌の鶏肉における汚染低減、ひいてはヒト食中毒の制御に繋がるものと期待される。

南九州地方で一般化している鳥刺しは、表面焼烙の加工が施されているが、日本全国で一般的に消費され、食中毒発生原因として取り沙汰される鶏刺しの多くはいわゆる刺身でこうした加工処理が行われていない例が多い。

今後は、生食用鶏肉の製造加工段階における衛生管理手法の確認と低減効果の検証を推し進めることで、応用可能な汚染低減対策の構築に繋げていきたい。

#### 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において、カンピロバクター保菌と *Bacteroides* 属構成比の間で相関性を継続的に検討することで、普遍性を実証した。更に、*Bacteroides* 分離株の *C. jejuni* の生存増殖性に対する制御効果を試験管内で明らかにすると共に、当該菌抽出物によっても同様の効果が表れる事象を見出した。来年度は、農場での実証試験へと進み、その有効性評価につなげたい。

## 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

検体数は少ないが外剥方式の処理場で生産されている製品とスーパーマーケット等で一般市販されている製品とを比較したところ、一般生菌数ではムネとササミが少ない傾向があった。また、外剥方式の処理場のモモでも、一般市販製品のモモでも約7割という高率のカンピロバクターが検出される。しかし、カンピロバクター数では外剥方式の処理場のモモの方が、市販のモモよりも少ない傾向があった。外剥方式の処理場でもカンピロバクター汚染は市販製品と同様であることが判明した。ただ、一般生菌数など差があるものも見受けられることから、さらに、検体数をふやし、その特徴を把握することが重要であると思われた。

## 3. 加工・流通段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

本研究では、カンピロバクターが食鳥肉内部へ浸潤性を示すことを数値として示すと共に、表面加熱の一手法である温浴加熱を用いた際にも部位あるいは検体の別により、一定の内部生残性を示すことを明らかにした。一方で、冷凍・真空包装・表面焼烙等の複合的対策が取られた鶏刺し製品については、カンピロバクター汚染は認められなかったことから、複合的対策の構築と運用が現実的な対策として有効に機能するものと考えられた。

## 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

生食用鶏肉として販売される鳥刺しのカンピロ

バクター汚染菌数は加熱用の鳥肉に比べ、相対的に低いことが明らかになった。我が国に浸透している鶏肉の生食については、鶏肉からカンピロバクターを除去する確実な方法を確立される迄は、一定のリスクを持つものと考えらるべきではあるが、生食用鶏肉の加工工程で実践される表面の十分な加熱焼烙等は現段階での応用的制御手法として機能しうる一案と考えられる。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 書籍

1) 朝倉 宏 . 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 . 食と健康 . 2016年8月号 . pp.18-24.

### 2. 論文

1) Ishihara K, Chuma T, Andoh M, Yamashita M, Asakura H, Yamamoto S. (2017) Effect of climatic elements on *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared in southern Japan from 2008 to 2012. *Poultry Sci.* epub. pew354.

2) 森田幸雄、小林光士 . (2016) わが国の食肉・食鳥肉の衛生状況 . 日本獣医師会雑誌 . 69 : 695-701.

3) 藤田雅弘、遠藤健太郎、塩野雅孝、森田幸雄、朝倉宏、山本茂貴 . (2016) 食鳥処理場におけるカンピロバクター交差汚染状況 . 日本食品微生物学会雑誌 . 33 (4) : 182-186.

### 3. 学会発表

1) 朝倉宏、山崎栄樹、小西良子、五十君静信、山本茂貴 . カンピロバクター・ジェジュニが顕す生存・生息のための環境応答 . 細菌学領域における基礎と臨床のクロストークセッション . 第90回日本細菌学会学術総会シンポジウム (仙台市、2017年3月)

2) 朝倉宏 . ゲノムデータに基づく、カンピロバク

ターの蔓延要因と宿主・環境適応機構の探知．  
第 37 回日本食品微生物学会学術総会．平成 28  
年 9 月．東京都．

- 3) 朝倉宏、山本詩織、小西良子、山本茂貴、五十  
君静信．*Campylobacter jejuni* が顕す、冷凍抵  
抗性関連因子の探索．第 37 回日本食品微生物  
学会学術総会．平成 28 年 9 月．東京都．
- 4) 森田幸雄．全国食肉衛生検査所協議会特別講  
演「食鳥肉の衛生管理」平成 29 年 1 月（東京  
都）
- 5) 人・動物・環境の調和と共存：人獣共通感染症  
および食品由来感染症制御からのアプローチ．  
平成 28 年度空気調和・衛生工学会大会．平成  
28 年 9 月（鹿児島）
- 6) 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 65 回日本獣医公衆衛生  
学会（九州）．平成 28 年 10 月（北九州）
- 7) 生食用と加熱用鶏肉におけるカンピロバクター  
汚染菌数の評価」第 9 回日本カンピロバクタ  
ー研究会．平成 28 年 11 月（東京都）
- 8) 森田幸雄．全国食肉衛生検査所協議会特別講  
演「食鳥肉の衛生管理」平成 29 年 1 月．東京都．

#### H. 知的財産権取得状況

該当なし

