

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）

「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」

分担研究報告書

カンピロバクターの鶏肉内部浸潤性ならびに

表面加熱による汚染低減効果に関する研究

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
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	渡邊真弘	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	森 篤志	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	小西良子	麻布大学 生命・環境科学部
研究協力者	品川邦汎	岩手大学
研究協力者	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：本研究では、食鳥肉において高い汚染率を示すカンピロバクターが鶏肉内部への浸潤性に関する検証を行うと共に、鶏肉表面を温浴加熱した際の汚染低減効果に関する定量的知見を得ることを目的とした。C. jejuni を国産鶏ムネ肉及びモモ肉表面に検体 400g あたり約 10^6 CFU となるよう接種し、1 時間保存後の内部浸潤性を検証したところ、最大で表面下 15mm 地点まで接種菌株が検出された。約 10^6 CFU の C. jejuni を表面に接種した鶏モモ肉及びムネ肉検体を 85 の温浴加熱に供し、加熱 0、1、2、3、5、10 分後の検体あたりの生存菌数を求めたところ、ムネ検体における生残菌数はモモ検体のそれよりも低い結果となった。10 分間の同加熱処理後における鶏検体内部への C. jejuni 浸潤性を検証したところ、モモ肉検体における C. jejuni の内部浸潤性は表面下 20mm 地点においても認められ、ムネ検体に比べ内部浸潤性が高い成績が示され、C. jejuni の鶏肉における表面加熱工程を通じた生残性は、当該菌の検体内部浸潤性と関連性が示唆された。また、表面加熱手法のみによる鶏肉中のカンピロバクターの完全な制御は困難であり、フードチェーンを通じ、複数の手法を併用することが現実的なリスク管理を図る手段と目された。実際に、鶏刺し製品として通信販売により入手可能であった計 24 製品（各 3 検体、計 72 検体）については、定性試験により何れもカンピロバクターは検出されなかった。来年度には、同じく食鳥処理あるいは流通段階において有用性が示唆されている殺菌剤による汚染低減効果を定量的に検討すると共に、前年度に実施した冷凍手法を含め、各手法の実施に伴う鶏肉の物性への影響をはかることで、現実的な応用的手法としての意義について明らかにしたい。

A. 研究目的

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、発生低減のための対策の構築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、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。

B. 研究方法

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

テトラサイクリン(Tc)、クロラムフェニコール(Cm)、エリスロマイシン(Em)に耐性を示す*C. jejuni*ヒト臨床分離株H115をTc、Cm、Emを含むミュー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 4.0×10^6 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接種し、4℃にて1時間保存した。その後、検体を取り出し、鶏肉検体中央表面の5cm x 5cmを垂直に切り出し、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)として個別に切り出した。これを10mlの緩衝ペプトン水に懸濁し、各懸濁溶液1ml, 100 μ l, 10 μ lを10mlのPreston培地(Tc、Cm、Emを含む)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、Tc、Cm、Emを含むmCCDA寒天培地に接種し、定型的集落の発育を確認すると共に、PCR法による確認試験を行った上で、最確数(MPN)表を用いて菌数を求めた。

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* H115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、滅菌鋏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

μLずつTc、Cm、Emを含む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(Tc、Cm、Emを含む)に接種し、42にて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mCCDA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。

C. 結果

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1gにおける平均検出菌数は、2.90対数CFUであった(図1)。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(図1)。

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400g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1g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(図2A)。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(図2B)。

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。表 1 に記した通り、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（表 1 A）。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（表 1 B）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る結果となった。

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（図 3）。

D. 考察

2007 年から 2016 年の間に報告されたカンピロバクター食中毒の事件数は 2,972 件、患者数は 18,893 名を数えた。ノロウイルスによる食中毒と対比して、本食中毒事例の多くは 1 事例あたりの患者数が少ない（いわゆる散発事例）傾向にある。その背景には、原因食品の加熱不十分な調理あるいは非加熱での喫食により、本菌の食品汚染分布や頻度に偏りが生じるためと目される。また、調理従事者からの食品汚染が相対的に少なく、ヒトからヒトへの二次感染も生じないこと等も本食中毒の特徴として挙げられる。しかしながら、大量調理施設において調理製造された食品を原因とし

た大規模集団食中毒も発生しており、本年度には加熱不十分な鶏肉食品を提供した屋外イベントにおいて、計 875 名の大規模食中毒患者が確認されていることは記憶に新しい。こうした加熱不十分あるいは非加熱の鶏肉食品については、現時点で明確な規制等は存在しない。しかしながら、原材料としての鶏肉にはカンピロバクター汚染リスクを完全に除去することは現状では困難であり、幼児や高齢者、更には免疫状態が健全な状態にないヒトについては、こうした食品を喫食することは避けるべきであることは言うまでもない。

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、単一手法のみでの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。

E. 結論

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

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

・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．

・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．

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

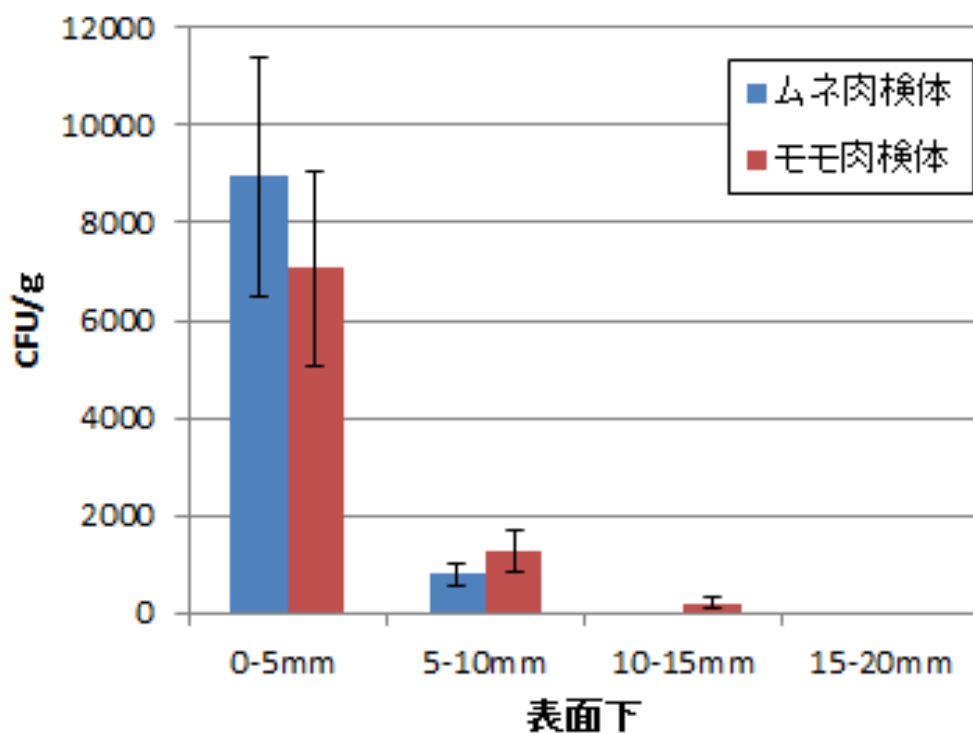
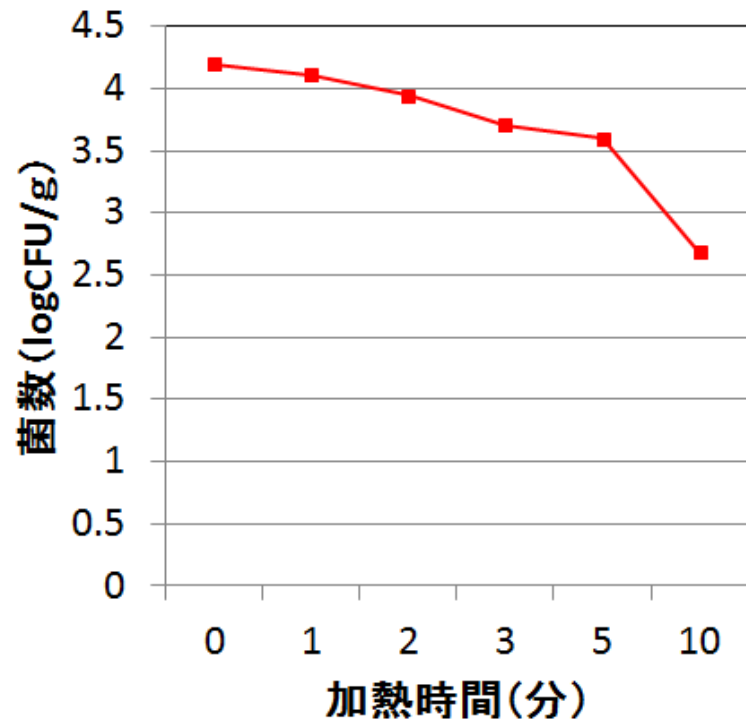


図1 . 鶏肉内部への *C. jejuni* の浸潤性 .

鶏モモ肉及び胸ネ肉について、表面に約 10^6 CFU の *C. jejuni* を接種し、4 にて1時間保存後、表面下 0-5mm、5-10mm、10-15mm、15-20mm の計4地点からの検出を行った。

A



B

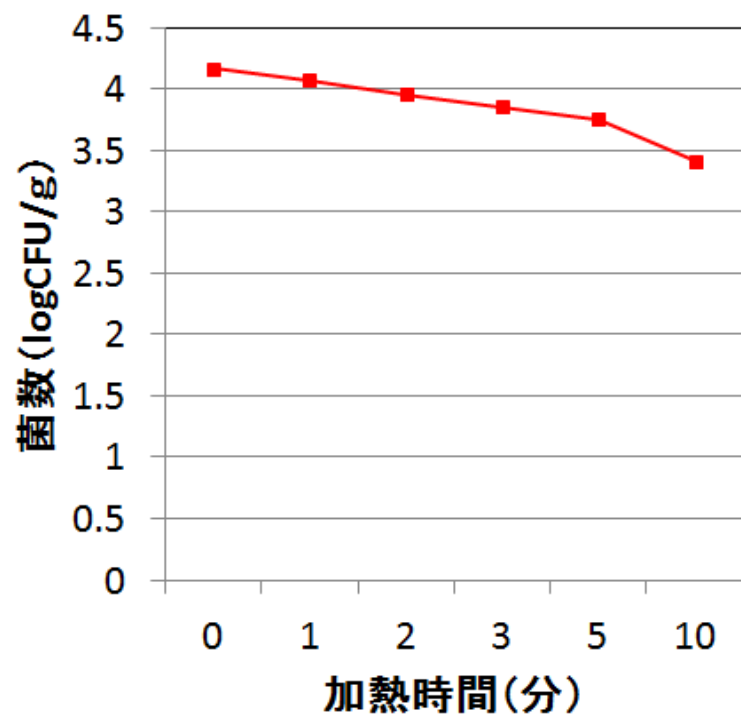


図2 . 85 温浴加熱を通じた鶏肉検体中のカンピロバクター生残性挙動 . A は鶏ムネ肉、B は鶏モモ肉での挙動を示す。

表 1. 85 温浴加熱を通じた鶏肉検体内部でのカンピロバクター生残性

A (ムネ肉検体)

表面からの深さ (mm)	A	B	C	D	E
0-5	+	+	+	+	+
5-10	+	+	+	+	-
10-15	+	-	-	-	-
15-20	-	-	-	-	-

B (モモ肉検体)

表面からの深さ (mm)	A	B	C	D	E
0-5	+	+	+	+	+
5-10	+	+	+	+	+
10-15	+	+	+	+	+
15-20	+	+	+	+	-

ムネ、モモ肉それぞれ 5 検体 (A-E) を用いて定性検出試験を行った。+/- は検出の有無を示す。