

令和元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）
「畜産食品の生物学的ハザードとそのリスクを低減するための研究」

研究代表者 佐々木 貴正 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨：鶏肉製品におけるカンピロバクターやサルモネラ汚染率は依然として高く、これら菌が原因となった食中毒事件の発生との関連性も多くみられる。このような状況を踏まえ、更なる汚染防止策の構築・推進に向け、リスクアナリシスの考え方に基づいた微生物規格基準の設定等に資する知見を進展・集積させる必要がある。そこで、当該製品を対象とした微生物定量的汚染実態データの集積を図ることを目的として、鶏肉製品におけるカンピロバクター等の定量的汚染実態に関する研究、畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究、鶏肉加工製品におけるサルモネラ等の汚染実態に関する研究、畜産食品の加工工程における殺菌技術とその殺菌効果に関する研究を行うこととした。

地方衛生研究所 6 機関の協力の下、鶏肉製品 254 検体について、ISO 10272-2:2017 に準じた定量試験に供した結果、94 検体（37.0%）からカンピロバクターが検出された。陽性検体の 74.5%（70 検体）は 2 log CFU/g 以下の検出菌数である一方、最大検出菌数は 3.62 log CFU/g という非正規分布を示した。地鶏（飼育期間：75 日以上）や成鶏（採卵を終えた鶏）に由来する製品 51 検体では 1 検体のみが陽性を示した一方、銘柄鶏を含む肉用若鶏（飼育期間：75 日未満）に由来する製品 203 検体では、45.8%（93 検体）の陽性率を示し、飼育日数がカンピロバクター検出菌数の影響要因の一つと推察された。次年度は、引き続き汚染実態調査を進め、詳細な定量的汚染実態の把握に努める。また、迅速かつ効率的な定量的データの収集に向け、国際的な第三者認証機関における妥当性評価を受けた自動生菌数測定装置（TEMPO）を迅速試験法の候補として選定し、肝臓と皮を調査検体として用い、上述の ISO 法に準じた 定量試験法との同等性を評価した。肝臓では両試験法間の相関関係数 (R^2) は 0.72 と高い相関性が認められた一方、皮では陽性検体であっても定量限界値以下又は定量限界値付近のものが多く、TEMPO 法の同等性を評価することができなかった。今後、皮等の低汚染検体における汚染菌数の定量化を含め、同法の同等性・有用性の評価を行う。サルモネラについては、加工度の高い製品（つみれ及びだんご）13 検体を調査し、61.5%からサルモネラを検出した。汚染菌数は最大で 23 MPN/25g であり、分離株の多くは 04 群であった。引き続き、これら加工製品の汚染実態調査を行うとともに分離株の性状解析を開始する。殺菌技術とその効果については、高圧処理（100-500MPa で 10 分間）により供試した 4 部位（モモ、ムネ、砂肝及びハツ）のすべてにおいて、圧力依存性に色調の明るさ及び黄色みが増す傾向が見られた。また、モモ肉及びムネ肉は圧力依存性に硬度が増す傾向が見られたが、砂肝及びハツの硬さは高圧処理によって変わらないことが示された。大きな肉質変化が認められなかった最大圧力である 300 MPa で処理した場合の殺菌効果については、一般細菌数：0.025 ~ 0.925 logCFU/g、大腸菌群：2.462 ~ 2.663 logCFU/g、腸内細菌科菌群：1.519 ~ 3.633 logCFU/g、の範囲であった。さらに、定量的データは得られなかったもののカンピロバクター及びサルモネラについても当該高圧処理条件下で殺菌効果があることが確認された。

研究分担者：	
朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所
岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者：	
池田徹也	北海道立衛生研究所
小嶋由香	川崎市健康安全研究所
阿部光一朗	川崎市健康安全研究所
山田和弘	愛知県衛生研究所
中村寛海	大阪健康安全基盤研究所
野本竜平	神戸市環境保健研究所
川瀬 遵	島根県保健環境科学研究所
山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所
町田李香	国立医薬品食品衛生研究所
米満研三	国立医薬品食品衛生研究所
大屋賢司	国立医薬品食品衛生研究所
鈴木穂高	茨城大学
西海理之	新潟大学
筒浦さとみ	新潟大学
Maksimenco Anastasiia	新潟大学
北條有紗	新潟大学
王 偉童	新潟大学

A. 研究目的

我が国では、畜産食品における食中毒菌の汚染防止を目指し、食肉加工施設等における衛生対策に積極的に取り組んでいるが、依然として畜産食品から食中毒菌がしばしば分離される。特に鶏肉製品におけるカンピロバクターやサルモネラ汚染率は、総じて高く、更なる汚染防止策の確立及びその推進が社会的に求められている。また、近年、国際的に食品安全領域においてリスクアナリシスの考え方が導入され、食品の微生物規格に基準値が設定されるようになってきた。このことは、定量的汚染実態デー

タの集積・分析が必要であることを示しているが、これまでの上記食中毒菌の汚染実態に関する研究の多くは定性試験の結果に限局される場合が極めて多く、定量的データの創出が国際整合を確保する上で必要不可欠である。

さらに、定量的データの集積にあたっては、国際的に妥当性が確認された定量試験法を用いて実施することが必要不可欠である。我が国では、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」で様々な食中毒菌や衛生指標菌に関する定量試験法が検討・作成されている他、食鳥処理工程で使用されるカンピロバクターの定量試験法は厚労省・実証事業等において作成・評価が行われている状況にある。一方、畜産食品に対する当該食中毒菌の標準的な定量試験法は未だ十分に議論が行われておらず、速やかな定量的データ創出が求められている。

以上の背景から、本研究では、国内主要消費地に流通する市販鶏肉製品におけるカンピロバクター等の汚染実態を定量的に把握する特色ある計画を立案した。本年度については、複数自治体の協力を得て、鶏肉製品におけるカンピロバクター汚染実態を定量的に調査することとした。また、この調査と並行して、MPN法を応用した多検体処理が可能なカンピロバクターの迅速定量試験法の確立を目指し、その基礎となる定量的データの収集を行うこととした。サルモネラについては、鶏肉加工製品における汚染実態の解明を目指し、定量試験法の評価を行うとともに、つみれ等の加工製品を検体とした定量的汚染実態調査を行うこととした。さらに、鶏肉製品においてこれら食中毒菌汚染を低減できる非加熱的殺菌

技術に関する情報を収集するとともに、実際の殺菌効果について検証を行うこととした。

B. 研究方法

1. 鶏肉食品におけるカンピロバクター等の定量的汚染実態に関する研究

地方衛生研究所計 6 機関の微生物試験担当者に対し、各所在地に流通する鶏肉製品を対象としたカンピロバクター定量試験の実施についての研究協力を求め、承諾を得た。

1.1 カンピロバクター定量試験法

カンピロバクター定量試験法については、国内で未整備であることを踏まえ、国際標準試験法である ISO 10272-2 : 2017 を基本としたが、検体調製については NIHSJ-02 法に準じて検体懸濁液調整には 5 倍希釈を採用した。

1.2 鶏肉製品検体の設定

モモ肉及びムネ肉を対象として、各 25g を検査対象とすることを基本とした。また、採材部位については、本菌汚染が外部から受けることが想定される現状を踏まえ、筋肉部位ではなく、皮部位を対象とすることとした。更に、対象とする鶏肉製品検体については、販売施設を把握した上で、表示に則り或いは聞き取り等を通じて、製品に関わる情報（生鳥の種別、食鳥処理場、加工年月日等）を収集することについて研究協力者との間で申し合わせを行った。

1.3 結果の解釈及び統計解析

各検体・希釈列につき、2 枚の mCCDA 平板を用いて得られた平均値を結果として採

用した。データに係る一般的統計情報、散布図作成、並びに各製品情報と検出結果との間での多変量解析には JMP15 (SAS Institute) を用いた。

2. 畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究

2.1 候補試験法の選定

多検体処理が可能であり、作業者の操作技術力の差による試験結果への影響を勘案し、作業工程の多くが自動化されている TEMPO 法を候補試験法として選定した。なお、TEMPO 法で使用する市販キットの対象検体は、研究開始時において食鳥洗い液及びスポンジ検体とされている。

2.2 試験法

国際標準試験法である ISO 10272-2:2017 に準じた定量試験法と上述の TEMPO 法と比較することとした。検体調製は、検体細切後に緩衝ペプトン水 (BPW) で 2 倍希釈し、1 分間のストマック処理後に、その希釈液から BPW を用いて 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液を作製した。菌数測定に関しては、ISO 法に準じた定量試験法の場合、2 倍希釈液では 4 枚の mCCDA 平板に 0.25ml ずつ、他の 2 つの希釈液では各 2 枚の mCCDA 平板に 0.1ml ずつを塗抹し、培養後に得られた集落数を集計し、その平均値を検出菌数として採用した。TEMPO 法の場合、操作プロトコールに従い、検体を調製・培養後、TEMPO 機器により算出された値を採用した。なお、低菌数汚染の有無と低菌数汚染への適用性を確認するため、ISO 10272-2 : 2017 に準じた定性試験法も実施した (検体 1g 中)。

2.3 調査対象検体の選定

近年カンピロバクター食中毒事件で原因食品として推定されることが多く、汚染率及び汚染菌数が比較的高いと報告されている肝臓と、海外で汚染モニタリング時の調査対象として使用されている皮を調査対象検体として選定した。また、これら検体の採取については、酸素の存在、低温など、鶏肉の加工・流通環境下におけるカンピロバクターの生存性の低さを考慮し、食鳥処理後短時間で店頭販売される可能性が高い鶏肉専門店2店舗で採取（購入）することとした。

3. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ等の汚染実態に関する研究

3.1 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法の確立

鶏肉加工製品へのサルモネラ属菌の添加回収試験を行い、サルモネラ属菌標準試験法を基本としたサルモネラ属菌定量試験法の確立を行った。

3.1.1 接種菌液の調製及び鶏肉加工製品への接種

鶏肉加工製品への添加回収試験には、鶏肉由来 *Salmonella* serovar Schwarzengrund SEC1011 株を用いた。カジトン培地に保存した SEC1011 株を Trypticase Soy Broth (TSB) に接種し、37℃にて18時間培養した。この菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて10倍階段希釈し、想定 10^3 もしくは 10^2 CFU/ml の希釈液 500 μ l を鶏肉加工製品（つみれ）に接種した。ストマッカー袋中の鶏肉加工製品（25 g）に調製した菌液を接種し、十分に手もみ処理をしてなじませた。実際の接種菌数は、

菌液の10倍階段希釈液を Trypticase soy agar (TSA) に塗抹し、37℃にて18時間培養して形成された集落数を集計し計算した。

3.1.2 最確数法によるサルモネラ属菌の定量

使用する定量試験法については、サルモネラ属菌標準試験法 (NIHSJ-01:2019) を基本とし、最確数 (MPN) 3本法による定量検査に応用することを検討した。菌液を接種した鶏肉加工製品（25 g）にペプトン加生理食塩水 225 ml を加え1分間ストマッカー処理し乳剤とした。調製した乳剤を、2倍濃度の緩衝ペプトン水 (BPW) 10 ml 入り試験管 3本へ10 ml ずつ接種した。また、10 ml のBPW入り試験管3本へ同乳剤を1 ml ずつ、さらに10 ml のBPW入り試験管3本へ0.1 ml ずつ接種した。計9本の試験管を37℃にて、 22 ± 2 時間前培養した。この前培養液を9本の試験管からそれぞれ、Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地へ1 ml 及び Tetrathionate (TT) 培地へ0.1 ml 接種し、42℃にて 22 ± 2 時間選択増菌培養した。選択増菌培養液をよく攪拌し、1白金耳量を分離用培地へ画線塗末し、37℃にて 22 ± 2 時間培養した。分離用培地は、硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地3種類及び、硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地4種類を用いた。各培地に形成されたサルモネラ属菌の定型集落を3個ずつ Triple sugar iron (TSI) 寒天培地及び Lysine Indole Motility (LIM) 培地に接種し、37℃にて 22 ± 2 時間培養した。培養後、定型的サルモネラ属菌の性状を示した菌株について、サルモネラ免疫血清を用いてO抗原の血清凝集試験を行い、サルモネラ属菌であ

ることの確定及び O 血清群の決定を行った。サルモネラ属菌陽性を示した試験管の本数から、米国農務省 食品安全検査局 微生物検査ガイドブック MLG Appendix 2.05 に従い MPN 値を求めた。

3.2 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量汚染調査

国内で流通する鶏肉加工製品について、サルモネラ属菌標準試験法によるサルモネラの定性試験を行い、陽性となった検体について今回確立したサルモネラの定量汚染調査を行った。

3.2.1 供試検体

国内で流通する鶏肉加工製品（つみれ及び肉団子）13 検体を購入し供試検体とした。

3.2.2 サルモネラの定性試験

サルモネラ属菌標準法に従って行った。検体 25 g に BPW 225 ml を加え、1 分間ストマッカー処理し、37 °C にて 22 ± 2 時間前培養した。この前培養液を RV 培地へ 1 ml 及び TT 培地へ 0.1 ml 接種し、42 °C にて 22 ± 2 時間選択増菌培養した。選択増菌培養液をよく攪拌し、1 白金耳量を MLCB 培地、XLD 培地及び CHS 培地へ画線塗末し、37 °C にて 22 ± 2 時間培養した。以降は、上述と同様に、サルモネラ属菌の同定及び O 群の決定を行った。

3.2.3 サルモネラの定量試験

サルモネラ属菌陽性となった検体について、上述と同様にサルモネラ属菌の同定及び定量を行った。但し、分離培地は MLCB 培地、XLD 培地及び CHS 培地を用いた。

4. 高圧処理による鶏肉及び内臓肉中の不活化に関する検討

4.1 検体

高圧処理の細菌低減実験に用いるモモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツは、東京都内及び新潟市内の鶏肉専門店で購入し、冷蔵状態で運搬後、5 時間以内に実験に供した。高圧処理による肉質変化の検討に用いるモモ肉及びムネ肉は、筋線維の方向が同一になるように 3 × 3 × 1 cm の大きさに切断した。砂肝は筋膜を除去してから半割にし、ハツは半割にして血餅を除去した。菌数低減効果の検討に用いる検体は、滅菌済みの器具を用いて 10 g 片に切断した。切断後の検体は、高圧処理用袋に入れて密封したのち、水と共に外袋に密封して二重包装とした。

4.2 高圧処理

二重包装済みの検体を Dr. CHEF（神戸製鋼所）を用いて、100、200、300、400 及び 500 MPa で 10 分間の高圧処理を行った。処理温度は、設定圧力到達時の温度が約 25 °C となるように設定した。

4.3 菌数測定

検体 10 g に 90 ml の滅菌リン酸緩衝液（PBS）を加えてストマッカー処理を行い、10 倍乳剤を作成した。また、必要に応じて PBS を用いて 10 倍階段希釈液を作成した。一般細菌数の測定は、Plate Count Agar 平板を用いた塗抹培養と並行して、簡易培地としてペトリフィルム AC プレート(3M)を用い、35 °C で 24 時間培養を行った。腸内細菌科菌群の測定にはペトリフィルム EB プレート(3M)、大腸菌群の測定にはペトリフィルム CC プレート(3M)を用い、製品に規定された条件で培養した。サルモネラ属菌の定量試験は、10 倍乳剤 100 µl を XLD 寒

天培地及び CHROMagar サルモネラに塗布し、24 時間後の定型集落数を計測し、確認培養後に集落数を確定した。サルモネラ属菌の定性試験は、ISO 6579-1:2017 に基づき、10 倍乳剤を 37 で 18 時間培養後にその一部を Rappaport-Vasiliadis (RV) 培地及び Muller-Kaufman Tetrathiocyanate (MkTTn) 培地に接種して、所定の温度及び時間の培養を行った。その後、XLD 寒天培地及び CHROMagar サルモネラに塗布し、24 時間後の定型集落の有無を確認し、定型集落の確認培養後に結果を判定した。カンピロバクターの定量試験は、10 倍乳剤 100 µl を CCDA 寒天 (SEL) 培地、CCDA 寒天 (OX) 培地及び mCCDA クリアー HT 寒天培地に塗布し、48 時間後の定型集落数を計測し、確認培養後に集落数を確定した。カンピロバクターの定性試験は、ISO 10272-1:2017 を一部改変し、10 倍乳剤 1.5 ml をボルトン培地 13.5 ml に接種し、37 で 4 時間培養後に 41.5 で 44 時間培養した。培養液 1 白金耳を上記の寒天培地に塗布し、微好気条件において 41.5 で 48 時間培養した。

4.4 色調及び硬度

未処理及び高圧処理を行った検体について、色差計を用いて色調を、レオメーター TP-10 を用いて硬度を計測した。

C. 結果

1. 鶏肉製品におけるカンピロバクター等の定量的汚染実態に関する研究

1.1 鶏肉製品におけるカンピロバクター定量試験成績の概要

地方衛生研究所 6 機関及び国立医薬品食

品衛生研究所の計 7 機関で 2019 年 6 月～12 月にかけて、計 254 検体の鶏肉製品を入手し、ISO 10272-2:2017 に準じたカンピロバクター定量検出試験を行った。

計 254 検体中、160 検体 (63.0%) はカンピロバクター不検出であった。また、陽性検体の検出菌数分布 (CFU/g) としては、1～10、11～20、21～30、31～40、41～50、51～100、101～200、201～300、301～500、501～1,000、>1,000 の範囲でそれぞれ 28、18、5、4、3、12、13、3、4、3、1 検体が分布した。

機関別では、機関 A、B 及び F が最大値・算術平均・分散の各項目で少値を示した一方、機関 E の最大値・算術平均・分散・標準偏差は他機関に比べ高い値を示した。

1.2 部位別比較結果

モモ・ムネ部位間でのカンピロバクター定量検出試験成績を比較したところ、陽性率はそれぞれ 35% (35 検体)、38.3% (59 検体) であった。最大値・分散・標準偏差・歪度等はモモで相対的に高い傾向を示したが有意差は認められなかった。

1.3 生鳥に関わる要因の探索

日本農林規格 (JAS) では、地鶏肉の規格を飼育期間 75 日以上等と定義されている (https://www.maff.go.jp/j/jas/kaigi/pdf/jas_tyousa_kai_sryou2_150609.pdf)。このことに着目し、各検体情報の原料となる生鳥の飼育日数について、日本食鳥協会が作成した地鶏銘柄鶏ガイド (<https://www.j-chicken.jp/anshin/guide.html>) を参照することにより、いわゆる肉用若鶏 (ブロイラー) 以外の地鶏・銘柄

鶏の識別を行った。

その上で、飼育日数 75 日を閾値として各検体の成績を比較したところ、75 日未満の飼育日数を経て出荷された銘柄鶏肉及び肉用若鶏肉計 203 検体では 93 検体が陽性となった（陽性率 45.8%）一方、75 日以上の飼育日数を経て出荷された成鶏肉及び地鶏肉検体については、計 51 検体のうち 1 検体のみが本菌陽性を示し（2.0%）、同検体菌数は 5CFU/g であった。

2. 畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究

2.1 肝臓及び皮におけるカンピロバクター検出状況

関東地方の鶏肉専門店 2 店舗（関東地域）で販売されていた肝臓 64 検体及び皮 27 検体を購入（2019 年 5 月～2020 年 1 月）し、ISO 法に準じた定量試験法及び定性試験法を実施した結果、肝臓検体（64 検体）では定性試験を含めカンピロバクターが検出された検体は 45 検体（70.3%）であり、そのうち 33 検体（51.6%）は菌数が 2.0 log CFU/g 以上であった。陽性検体のすべてから *Campylobacter jejuni* が検出され、1 検体では *C. coli* も検出された。

カンピロバクター検出率は、両店舗間で大きく異なり、店舗 A における検出率は 33.2%（7/21）であったのに対し、店舗 B における検出率は 88.4%（38/43）と 2 倍以上で、統計学的にも有意（フィッシャーの正確確率検定： $P < 0.01$ ）に高かった。さらに、汚染菌数についても店舗 B の検体の 62.8%（27/43）で 2.0 log CFU/g 以上であったのに対し、店舗 A の検体では 28.6%（6/21）が 2.0 log CFU/g 以上であった。

両店舗間による購入条件の主な違いは、購入時期（店舗 A：2019 年 5 月～11 月、店舗 B：2019 年 10 月～2020 年 1 月）と購入時間（店舗 A：午前 10 時頃、店舗 B：午後 1 時頃）であった。

皮検体（27 検体）では 14 検体（51.9%）でカンピロバクターが検出され、すべて *C. jejuni* であった。陽性 14 検体のうち 6 検体は定性試験法のみ陽性であり、菌数が 2.0 log CFU/g 以上であったのは 3 検体のみであった。

2.2 肝臓及び皮における ISO 法に準じた定量試験法と TEMPO 法との相関性

上述の肝臓 64 検体のうち 43 検体について同時に TEMPO 法を実施した。5 検体ではカンピロバクターは検出されず、1 検体では ISO 法の定性試験法のみカンピロバクターが検出され、残りの 37 検体では、ISO 法と TEMPO 法の両方からカンピロバクターが検出された。この 37 検体における両試験法間の相関係数（ R^2 ）は 0.72 であり高い相関性が認められた。

皮検体では上述の 27 検体のうち 13 検体について同時に TEMPO 法を実施した。両試験法においてカンピロバクターが検出されたのは、1 検体のみ（ISO 法に準じた定量試験法の結果は 3.46 log CFU/g、TEMPO 法の結果は 3.56 log CFU/g）であった。残りの 12 検体のうち、7 検体では ISO 法に準じた定性試験法を含めてカンピロバクターは検出されず、4 検体では ISO 法に準じた定量試験ではカンピロバクターが検出されたもののいずれも 1.18 log CFU/g と菌数が少なかった。残りの 1 検体は TEMPO 法のみ検出（1.02 log CFU/g）された。両試験法で定

量的データが得られた検体数が少なかったことから、相関性について評価することができなかった。なお、TEMPO 法において、肝臓検体、皮検体ともに2倍希釈液を使用した場合、さらに5倍希釈液を作製・使用した場合には、試料の混濁が原因と考えられる試験結果の大きなバラツキが見られたため、TEMPO 法では10倍希釈液を採用した。

3. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ等の汚染実態に関する研究

3.1. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法の確立

3.1.1 高濃度のサルモネラの添加回収試験

高濃度のサルモネラとして、想定 500 CFU/500 μ l に調製した菌液の実際の菌濃度は、480 CFU/500 μ l であった。MPN 3 本法において、7 種類の分離用培地におけるサルモネラ陽性管の判定結果はすべて同じであった。10 ml 及び 1 ml の乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。0.1 ml の乳剤を接種した試験管においては、3本中2本の陽性であった。サルモネラ陽性を示した管数から算出した MPN 値は 1,150 MPN/25 g 検体であり、この試験で得られた MPN 値の 95%信頼区間は 225-5,000 であった。

3.1.2 低濃度のサルモネラの添加回収試験

低濃度のサルモネラとして、想定 50 CFU/500 μ l に調製した菌液を用いた添加回収試験を3回行った。実際に接種した菌濃度は、3回の試験でそれぞれ、93、53及び60 CFU/500 μ l であった。MPN 3 本法において、7 種類の分離用培地におけるサルモネ

ラ陽性管の判定結果はすべて同じであった。1 回目の試験では、サルモネラは、10 ml 及び 1 ml の乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。0.1 ml の乳剤を接種した試験管においては、3本中3本とも陰性であった。サルモネラ陽性を示した管数から算出した MPN 値は 600 MPN/25 g 検体であり、この試験で得られた MPN 値の 95%信頼区間は 105-2,500 であった。2 回目及び 3 回目の試験結果は同じであり、いずれの試験においても、サルモネラは、10 ml の乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。1 ml の乳剤を接種した試験管においては、3本中1本が陽性であり、0.1 ml の乳剤を接種した試験管においては、3本中3本とも陰性であった。2 回目及び 3 回目の試験において、サルモネラ陽性を示した管数から算出した MPN 値は 108 MPN/25 g 検体であり、この試験で得られた MPN 値の 95%信頼区間は 22.5-450 であった。

3.2 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量汚染調査

3.2.1 定性試験

供試した鶏肉加工製品（鶏肉つみれ及び鶏肉だんご）13 検体のうち、冷凍製品 2 検体はいずれも定性試験陰性であった。冷蔵製品 11 検体では 8 検体がサルモネラ陽性であり、陽性率は 72.7% であった。全 13 検体での陽性率は 61.5% であった。サルモネラ陽性を示した 8 検体から分離された菌株（検体あたり 2-6 菌株）の 0 血清群の内訳は、6 検体から 04 群、1 検体から 07 群及び 2 検体から 08 群であった。

3.2.2 定量試験

定性試験で陽性を示した検体におけるサ

ルモネラ菌量を MPN 3 本法で測定した。検体 25 g あたりの MPN 値は 23 MPN (0.9 MPN/g) が 2 検体、9 MPN (0.4 MPN/g) が 3 検体及び、定量試験陰性 [7.5 MPN (0.3 MPN/g) 未満] が 3 検体であった。

4. 高圧処理による鶏肉及び内臓肉中の細菌の不活化に関する検討

4.1 高圧処理が鶏肉及び内臓肉の肉質変化に及ぼす影響

100、200、300、400 及び 500 MPa の圧力で 10 分間処理したモモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツについて、色調と硬度の変化を測定した。その結果、4 部位すべてにおいて色調の明るさの指標である L 値及び黄色みの指標である b 値が増す傾向が見られた。モモ肉及びムネ肉では、赤みの指標である a 値には高圧処理による大きな変化は見られなかったものの、砂肝及びハツでは、圧力依存性な a 値の上昇傾向が見られた。肉眼的観察では、いずれの部位も、300 MPa の処理により肉色に白濁がみられ、400 MPa 以上の処理で、その傾向がより顕著であった。

硬度の指標である最大破断点の荷重 (N 値) はムネ肉の未処理検体では 9.855 N であったが、500 MPa での処理後は 17.738 N となり、硬化傾向を示した。同様に、モモ肉の N 値は未処理での 10.959 N から 500 MPa での処理後は 17.585 N となり、モモ肉及びムネ肉は圧力依存性に硬度が増す傾向が見られた。一方、砂肝及びハツの硬さは高圧処理によって大きく変わらないことが示された。

4.2 高圧処理の鶏肉及び内臓肉に対する

一般細菌の低減効果

モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツを自然汚染している一般細菌に対する高圧処理の菌数低減効果を調べた。処理圧力には、肉質変化が許容範囲と考えられた最大圧力である 300 MPa を用いた。高圧処理の結果、ムネ肉中の一般細菌数は 0.025 log CFU/g、モモ肉では 0.915 log CFU/g、砂肝では 0.875 log CFU/g、ハツでは 0.925 log CFU/g 低減していた。簡易培地を用いた場合の一般細菌数を混釈培養の結果と比較したところ、いずれの部位でも結果の差は ± 0.5 log CFU/g 以内であり、ほぼ同等であると考えられた。

4.3 高圧処理の鶏肉及び内臓肉に対する衛生指標菌の低減効果

モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツを自然汚染している大腸菌と腸内細菌科菌群に対する、高圧処理の菌数低減効果を調べた。300 MPa で 10 分間の高圧処理の結果、ムネ肉中の大腸菌群菌数は 2.462 log CFU/g、モモ肉では 2.663 log CFU/g、砂肝では 2.663 log CFU/g、ハツでは 2.643 log CFU/g 低減していた。腸内細菌科菌群は、ムネ肉で 1.519 log CFU/g、モモ肉で 1.653 log CFU/g、砂肝で 3.633 log CFU/g、ハツで 3.230 log CFU/g 低減していた。大腸菌群は 4 部位すべてで高圧処理により検出限界未満となったが、腸内細菌科菌群はモモ肉及びムネ肉で高圧処理後も菌が検出された。

4.4 高圧処理の鶏肉及び内臓肉に対する食中毒菌の低減効果

モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツを自然汚染しているサルモネラ属菌とカンピロバク

ターに対する、高圧処理の菌数低減効果を調べた。高圧処理前のムネ肉、モモ肉及び砂肝からサルモネラ属菌及びカンピロバクターが分離されたが、300 MPa で 10 分間の高圧処理の結果、ムネ肉、モモ肉及び砂肝はサルモネラ属菌が陰性となった。カンピロバクターについては、ムネ肉及び砂肝で高圧処理後に陰性となったが、モモ肉では一部検体から増菌培養後に検出された。

D. 考察

鶏肉食品におけるカンピロバクターの定量的汚染実態について、供試検体の約 63% はカンピロバクター不検出であった。ただし、今回使用した定量試験法の検出限界値は理論値として 5 CFU/g であり、同値未満の汚染を受けた検体についてはすべて不検出と判定される。従って、汚染の少ない検体、とりわけ今回見出された 75 日以上の飼育日数を経て出荷された生鳥由来の鶏肉製品については、汚染がないことを明確に示すと言及するには至らないと考えられ、今後検討を進めるべき課題である。また、部位間での成績比較を通じ、モモはムネに比べ、分散等の数値が大きく、検体間でのばらつきが生じやすい部位と推察された。モモはムネに比べ、脱骨工程等での作業に時間と労力を要するとされ、交差汚染が生じる可能性が大きいこともその要因と目される。こうした脱骨・成形工程については自動化機器の導入が大規模施設では進んでおり、バラツキの軽減に寄与する可能性も考えられる。

国内外を含め、これまで多くの生鳥におけるカンピロバクター保菌動態について報

告がなされているが、基本的に肉用若鶏を対象とした時間軸で検討されているため、飼育日数の経過に伴う生鳥腸管内でのカンピロバクター保菌に係る長期的動態については、今後の研究報告が期待される場所である。南九州地方で製造加工・流通販売される生食用食鳥肉製品の多くは地鶏肉または成鶏肉が原料とされており、これらが肉用若鶏肉・銘柄鶏肉等に比べて、原料段階で相対的に低い汚染状況を示すとすれば、リスク管理上、適切な原料の選択が図られた方法をとっているとも解釈される。こうした可能性を探索する上でも次年度以降も引き続き、複数地域での鶏肉汚染実態を調査することは意義が深いと考えられる。

さらに、定量試験の実施に先立ち、研究協力者との間で、培地選択の有用性について議論が交わされた。すなわち、現時点では複数のメーカーより特定酵素基質培地が製造販売されていることが背景にあった。本年度は、ISO 法に準じた試験を実施したが、次年度には、選択分離培地に関する検討もあわせて進め、その有効性についても評価を行いたい。

迅速試験法については、その候補とした TEMPO 法は検体調製以降の作業のほとんどが自動化されており、また、食鳥洗い液及びスポンジ検体を対象としたカンピロバクター用キットも販売されているため、TEMPO 機器の操作方法を修得すれば、作業者の操作技術力の違いにより生じるばらつきが少ない定量結果を得ることができる。今回、肝臓については ISO 法に準じた定量試験法と高い相関性を有する結果を得られることが確認された。一方、皮ではカンピロバクターが検出された検体であってもその汚染

菌数は定量限界以下又は定量限界値付近であるものがほとんどで、同等性の評価をすることができなかった。ISO法に準じた定量試験法（mCCDA寒天培地に階段希釈した液を塗抹する方法）であれば、検体の希釈率を低倍にしてmCCDAに塗布するという対応や塗抹液量を増やすといった対応によって少ない菌数でも定量結果を得ることが可能である。しかし、TEMPO法では、2倍希釈液（細切後に1分間のストマック処理）ではかなり検体が混濁しており、試験成績も安定しなかった。当該キットの対象検体が食鳥洗い液及びスポンジ検体となっていることや測定原理を考慮すると混濁した検体の定量試験法として適用することは困難であると考えられた。従って、TEMPO法を用いて低菌数検体の定量的データを得るためには、1検体当たりを使用するキット数を増やす、又は混濁の少ない検体調製法（濃縮など）を確立する必要がある。次年度は、皮検体を中心に、検査コストを考慮した検体調製法の改良を行う予定である。また、肝臓におけるカンピロバクター汚染率及び汚染菌数について、店舗間で大きな違いが認められた。両店舗ともに店舗内だと体から肝臓を取り出して店頭販売しており、考え得る購入条件の違いは、購入の時期と時間であった。肉用鶏群におけるカンピロバクター感染率は夏季に高く冬季に低くなることが知られており、購入時期で考えると店舗Bの方が低くなると考えられるが、実際には逆であった。一方、購入時間で考えた場合、カンピロバクターは環境抵抗性が低いため、と体からの摘出後の時間経過により菌数が減少する可能性があり、今回の試験結果と矛盾しない。

肝臓のカンピロバクター汚染状況が時間によって大きな影響を受けるのであれば、汚染実態調査において、店頭販売日と購入時間、また、検体採取から試験開始までの時間によって試験結果が影響を受けることになるため、次年度は、時間経過による菌数変化を含め、TEMPO法による定量試験の可能性について詳細な評価を行う予定である。

サルモネラについては、今回、サルモネラ属菌標準試験法（NIHSJ-01:2019）を最確数（MPN）3管法に応用した定量試験法を作成し、鶏肉加工製品中のサルモネラ属菌の定量試験に有用であることが示された。分離されたサルモネラ属菌のO血清群は、O4群、O7群及びO8群であった。近年、肉用鶏ではInfantis（O7群）に加えSchwarzengrund（O4群）、Manhattan（O8群）などの血清型も増加傾向にあり、今回の調査結果と合致した。定量的汚染実態調査は次年度も継続するが、本年度の調査では、高濃度のサルモネラに汚染された検体はなかった。次年度は、定量的汚染実態調査の継続に加え、分離株の血清型別及び分子遺伝学的解析を開始する予定である。鶏肉加工製品中の汚染率及び汚染菌数並びに、分離株の血清型及び遺伝子型の関連を解析する事によって、汚染実態が明らかになることが期待される。

高圧処理については、モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツの4部位に圧力依存性に明るさの上昇傾向がみられ、肉眼的にも白濁していた。牛肝臓を対象とした先行研究では、大腸菌に対する菌数低減効果は200MPaで10分間の高圧処理では見られず、300MPa以上で観察されており、本年度の検討

は鶏肉の4部位にある程度の肉質変化を起こすものの、比較的变化が抑えられていた。菌数低減効果が期待される300 MPaで10分間の高圧条件下では、グラム陰性菌である腸内細菌科菌群及び大腸菌群については2 log CFU/g前後の大幅な菌数低減効果が認められた一方、バチルス属等のグラム陽性菌を多く含むと思われる一般細菌については1 log CFU/g前後の低減にとどまった。カンピロバクター及びサルモネラ属菌については、今回の処理条件でほとんどの検体において定性試験法の検出限界未満となったが、モモ肉のみ高圧処理後にも定性試験法でカンピロバクターが検出された。次年度も、肉質変化の少ない殺菌技術に関する情報収集及びその殺菌効果の検証を実施する予定である。

E. 結論

国内に流通する鶏肉製品254検体を対象として、計7機関でカンピロバクター定量検出試験を実施した。不検出検体は全体の63%を占めた一方、最大検出菌数は3.62 log CFU/gとなる等、リスク評価にあたり汎用される本菌の最少発症菌数(500~800 CFU)を大幅に上回る検体も確認された。原料鳥の飼育日数を指標とした分類により、肉用若鶏・銘柄鶏由来鶏肉製品は、地鶏・成鶏由来のそれに比べ、相対的に高い検出結果となった。今後、飼育日数の長期化がカンピロバクター保菌に与える影響についても検討すべき課題として抽出されたほか、低い菌数を示した後者については定性検出試験をあわせて行うことが、本菌汚染状況を明確化する上で必要と思われた。加えて、

本菌の定量試験法については、リスク評価に資する知見の更なる集積が求められることから、国内でも喫緊に検討・整備する必要がある。

TEMPO法によって得られた肝臓検体の定量値はISO法と高い相関性があることが判明した。一方、皮検体では、陽性検体であっても定量限界値以下又は定量限界値付近のものが多く、ISO法との同等性を評価することができなかった。従って、皮検体の場合には、検体濃縮などの検体調製法の改良を行い、その上で同等性について評価する必要があると考えられた。

鶏肉由来サルモネラ属菌株の添加回収試験によって、作成したサルモネラ定量試験法は概ね接種菌量を反映した値を得ることができた。また、これまでにサルモネラ陽性率61.5%(冷凍製品では0%及び冷蔵製品では72.7%)、汚染菌量は最大で23 MPN/25 g(0.9 MPN/g)検体であり、最も高頻度に分離されるのはO4群であるとの結果を得ることができた。

高圧処理については、モモ肉及びムネ肉では圧力依存性に肉色が白化及び黄化する傾向及び肉が硬化する傾向が見られた。一方、砂肝及びハツでは、高圧処理による色調及び硬度の変化が限定的であることが示された。肉質変化が比較的少ない300 MPaで10分間の高圧処理により、鶏肉及び内臓肉中の細菌数低減が可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

2.1 朝倉宏．食鳥処理場の衛生管理の動向
と微生物モニタリングの検討状況について．
第 40 回日本食品微生物学会．2019 年 11
月 28 日．東京都．

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし