

令和元年度厚生労働科学研究（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」

分担研究報告書

「畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究」

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  
研究協力者 米満研三 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

**研究要旨：**カンピロバクター食中毒は細菌性食中毒の中で近年最も発生届出件数が多く、リスク管理の優先度が高い細菌性食中毒の一つである。鶏肉（肝臓を含む。）製品の喫食が原因と推定されることが多いことから、カンピロバクター食中毒の発生低減には、鶏肉製品におけるカンピロバクター汚染の低減化が有効であると考えられている。近年、食品安全領域にリスクアナリシスの考え方が導入され、そのリスク評価における定量的データの重要性が年々高まっている。こうした状況から、本研究課題では、定量的データを効率的に収集するために不可欠な多検体処理可能な迅速試験法の確立を目的とした。情報収集の分析の結果、最確数（MPN）法に基づく微生物定量試験法として開発され、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た。また、文献等によりカンピロバクター汚染菌数が高く、食中毒事件の原因食品として推定されることが多い肝臓と海外において汚染モニタリングの調査対象検体となっている皮を調査検体として選定した。当該検体を鶏肉専門店で購入し ISO 10272-2:2017 に準じた定量試験法による菌数との比較を行った。なお、低菌数汚染の有無についても確認するため、ISO 10272-1:2017 に準じた定性試験法も実施した。ISO 法に準じた定量試験法及び TEMPO 法の両試験法からカンピロバクターが検出された肝臓 37 検体について、両試験法間の相関係数（ $r^2$ ）は 0.72 と高い相関性が認められた。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、TEMPO 法の同等性を評価することができなかった。TEMPO 法の検査プロトコールにおける定量限界値は 10 CFU/g（検体を 10 希釈して使用）であるため、低菌数汚染検体について TEMPO 法で定量値を得るためには、検体を濃縮するなどの検体調整法の改良が必要であることが判明した。次年度は検体調整法の改良を含め、TEMPO 法の詳細な評価を行う予定である。

**A. 研究目的**

我が国を含めカンピロバクター食中毒は毎年発生件数が多く、国際的にリスク管理すべき食中毒の1つとされている。厚生労働省の食中毒統計によれば、細菌性食中毒の中では例年最も発生届出件数が多く、発生低減に向けた対策の推進が社会的に求めら

れている。

近年、食品安全領域にリスクアナリシスの考え方が導入され、そのリスク評価に対する定量的データの重要性が目立つようになった。このような状況の中、カンピロバクター食中毒の原因として推定された食品の多くは鶏肉料理であることから、

2009年には食品安全委員会がリスク評価（鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ）を行ったが、その後の発生状況に大きな変化は認められていない。

その後も食品の国際規格を作成するcodex委員会で鶏肉のサルモネラ及びサルモネラのコントロールのためのガイドラインが作成されるなど定量的データの重要性はさらに高まっている。こうした状況から、本研究課題では、定量的データを効率的に収集するために不可欠な多検体処理が可能な迅速試験法の確立を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 候補試験法の選定

多検体処理が可能であり、作業者の技量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. 試験法

本研究では、国際標準試験法であるISO 10272-2:2017(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、検体を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、検体を調整し、培養後に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(定性試験法)についても実施した(ただし検体1g中)。

### 3. 調査対象検体の選定

本研究では、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、低温などの鶏肉の加工・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。

## C. 結果

### 1. 肝臓及び皮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(表1)。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(表2)。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. 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(図1)。

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法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。

## D. 考察

TEMPO法は検体調製以降の作業のほとんどが自動化されているため、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バラツキが少ない定量結果を得ることができる。今回使用したキットは、研究開始時点で食鳥洗い液及びスポンジ検体を対象としていたが、本年度の研究成果により、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。肝臓のカンピロバクター汚染については、既報及び今回の研究において、陽性検体のほとんどに定量可能な菌数が存在していることから、当該キットの試験プロトコールに従った作業を行うことでISO法と同様の結果が得ら

れると考えられた。

一方、皮検体では陽性検体の多くは定量限界以下又は定量限界値付近であり、現行の試験プロトコールでは定量値を得ることが困難であった。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。

さらに、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で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の方が低くなると思われるが、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、次年度については、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。

## E. 結論

鶏肉専門店2店舗で購入した肝臓64検体及び皮27検体について、ISO法に準じたカンピロバクター定量試験を実施するとともに、肝臓43検体及び13検体についてはTEMPO法による定量試験を実施した。肝臓検体では、半数以上がISO法により $2.0 \log \text{CFU/g}$ 以上の汚染菌数があることが判明し、また、TEMPO法による試験結果はISO法に準じた定量試験法と高い相関性があることが確認された。以上の研究成果により、検体が肝臓である場合には、TEMPO法はISO法に準じた定量試験法と同等の結果を得られる可能性があることが確認された。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、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。

また、肝臓の汚染状況について、店舗間で大きく異なり、購入時間の違いが原因の1つとして挙げられた。このため、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。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

(学会発表)

なし

(論文発表)

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表1 肝臓及び皮におけるカンピロバクター検出状況

検体	検体数	陰性	菌数 (log CFU/g)			
			定性試験陽性	1.0≤ X<2.0	2.0≤ X<3.0	3.0≤ X
肝臓	64	19	2	10	28	5
皮	27	13	6	5	2	1

表2 購入店舗間による肝臓検体のカンピロバクター汚染状況の違い

検体	検体数	陰性	菌数 (log CFU/g)			
			定性試験陽性	1.0≤ X<2.0	2.0≤ X<3.0	3.0≤ X
店舗A	21	14	1	0	4	2
店舗B	43	5	1	10	24	3

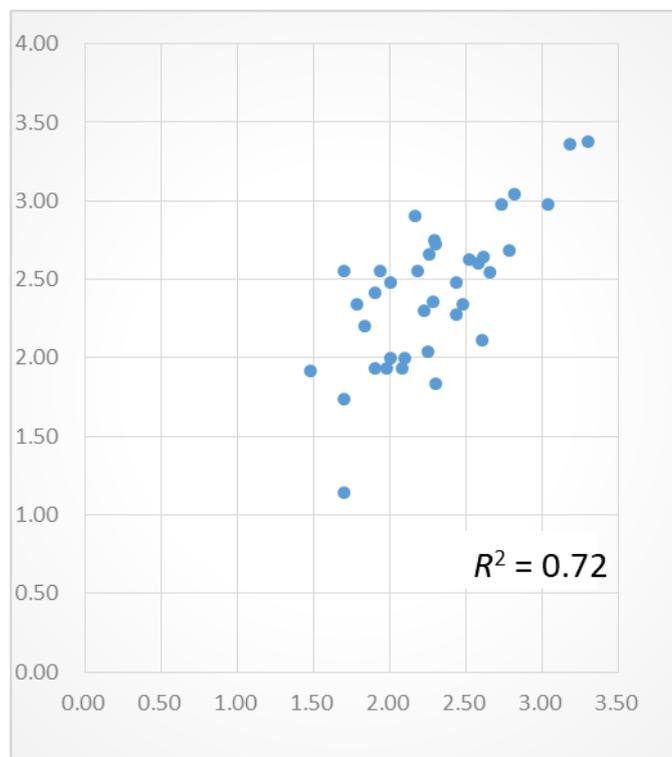


図1 肝臓における ISO 法に準じた定量試験法と TEMP 法との相関性