

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**

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

**研究代表者 朝倉 宏**

平成 28 (2016) 3 月



**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**

平成 28 ( 2016 ) 年 3 月





## 目次

### ・ 総括研究報告

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

朝倉 宏

----- 3

### ・ 分担ならびに委託研究報告

#### 1. 農場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

生産段階におけるブロイラーニワトリの盲腸内菌叢動態に関する研究

山本 茂貴、朝倉 宏 他

----- 15

#### 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

食鳥処理現場での内臓摘出処理の情報収集とエアークラーク設置食鳥処理場について

森田 幸雄 他

----- 25

#### 3. 流通段階におけるカンピロバクター制御に関する研究

応用的冷凍処理による鶏肉中の汚染制御に関する研究

朝倉 宏 他

----- 33

#### 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

生食用として流通する食鳥肉の汚染実態調査

中馬 猛久

----- 49

### ・ 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 57

平成 27 年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者

山本 茂貴 東海大学  
森田 幸雄 東京家政大学  
中馬 猛久 鹿児島大学

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  
茶藪 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)





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、エアーチラー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チラー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、出荷時齢のブ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デックスカンパニー(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(25g)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25g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25g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100μlをバンコマイシン10μg/ml、テトラサイクリン20μg/ml、バシトラシン10μg/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PBS10ml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(1.2~1.4kg)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℃以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3ml、300μl、30μlを10ml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1ml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ヨン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℃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℃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100μl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℃、44℃、35℃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社単独の処理機器であった。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た、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36MPN/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

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）

「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

### 生産段階におけるブロイラー鶏の盲腸内菌叢動態に関する研究

研究分担者	山本茂貴	東海大学海洋学部食品科学専攻
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	茶園 明	NPO 法人 日本食品安全検証機構
研究協力者	渡辺邦雄	NPO 法人 日本食品安全検証機構
研究協力者	川本恵子	帯広畜産大学
研究協力者	倉園久生	帯広畜産大学
研究協力者	猪子理絵	北海道帯広食肉衛生検査所
研究協力者	村上覚史	東京農業大学
研究協力者	橘 理人	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
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**：国内7養鶏農場より出荷されるブロイラー鶏盲腸便を計60検体を採材し、カンピロバクター分離を試みた。3農場由来の同検体は全て本菌陰性を示したが、残り4農場由来の検体については、計37検体で本菌陽性を示した（分離陽性率74%）。MLST解析を通じ、各農場ではほぼ同一遺伝子型株の分布が確認されたが、複数の遺伝子型株の分布を示す農場も認められた。これらの検体の構成菌叢を比較することで、*Bacteroides*属菌の構成比率と、カンピロバクター保菌との間に統計学的関連性が見いだされた。また、カンピロバクター陰性農場であるC農場については、18日齢以降の鶏盲腸菌叢に係る経時変動を検討したところ、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指標としても用いられていることから、本属菌を指標とする飼養管理は、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すべとなるものと推察される。今後は、カンピロバクター保菌に対する影響評価を行い、その有用性について更なる知見の集積にあたりたい。

#### A. 研究目的

カンピロバクター(*Campylobacter jejuni*および*C. coli*)による食中毒は国内外を問わず、細菌性食中毒の中で最も多い傾向が近年続いており、社会的関心も高い。厚生労働省食中毒統計<sup>1)</sup>によると、2014年に発生したカンピロバクターを原因物質とする食中毒件数は計306件、患者数は1,893人にのぼっており、同年の食中毒事例総数976件の約31.4%を占めている。食中毒事件の報告は、ごく一部に限られるとする疫学

的見解を踏まえると、実際に本食中毒の罹患患者数は更に多いと想定される。

また、カンピロバクター食中毒において、発症患者の多くは下痢を主徴とする予後良好な病態を顕すにとどまるが、一部の患者では、神経変性症の一種であるギランバレー症候群を併発する危険性もあることから、本食中毒の予防策を構築することは、公衆衛生学上の意義も高いと考えられる。

本食中毒の原因食品や感染経路について

は、これまでに多数の疫学研究が積み重ねられ、非加熱あるいは加熱不十分な調理を経た鶏肉や牛肉等がヒトの食中毒の最も主要な原因食品と認識されている。その中でも鶏をはじめとする家禽類では、導入時にはカンピロバクターが検出されない事が知られているが、生後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<sup>2)</sup>。国内に流通する鶏肉での本菌汚染は、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、生産段階における本菌制御は、カンピロバクター食中毒の低減をはかるにあたって、最も根源的な課題と捉えられるため、その対策が求められている。

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係る知見には未だ乏しく、これらに係る知見の更なる集積が求められている。

鶏生体内における本菌の汚染（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、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<sup>4-7)</sup>。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<sup>8)</sup>あるいは有機酸代謝能<sup>9)</sup>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<sup>10)</sup>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<sup>11-12)</sup>、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、同検体の構成菌叢を比較した。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農場については、更に飼料切替時期に応じて、複数回採材を行い、菌叢の経時変動に関する知見を得たので、報告する。

## B. 研究方法

### 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(ニッスイ)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) (Thermo Fisher) 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 (ニッセイバイオ) に加え、42 °C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 °C 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

1 . で調整した懸濁溶液残液より、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 . MLST 解析

*Campylobacter* MLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>) 上に記載のある方法に従い、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 (CLC Bio-Qiagen) 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、E-gel Size Select 2 % (Thermo Fisher) および Ampure XP (Beckman) を用いて、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 (キアゲン) 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 プログラム (ワールドビュージョン) を用い、クラスター解析を行った。

## C . 結果

### 1 . 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。農場別の分離培養成績については、表 2 に示す。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。また、分離株については、何れも *C. jejuni* であった (表 2)。

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 .MLST 解析による農場内分布株の同一性に関する検討

同一の管理会社下にあるA及びB農場を対象として、分離株の遺伝子型別を行った。結果として、各農場単位では、A農場では複数の遺伝子型株が分布していたが(ST-5255, ST-2274)、B農場では同一遺伝子型(ST-2274)株のみが認められた(表2)。

## 3 .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。その概要については、図1に示す。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。

## 4 .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鶏生体より、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* 属が同定された。反対に、*Flavonifractor* 属、*Oscillibacter* 属、*Escherichia* 属等の構成比率は経時的に減少した(図2)。

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。

## D . 考察

本研究では、養鶏農場において採材した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ことで、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* 属の構成比率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<sup>14)</sup>。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<sup>15)</sup>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<sup>16)</sup>、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。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

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）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## H. 引用文献

- 1) 厚生労働省食中毒統計．([http://www.mhlw.go.jp/stf/seisaku\\_nitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisaku_nitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html))
- 2) 朝倉宏．2015．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．平成24-26年度

- 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保安全確保推進研究事業）総合報告書. p19-29.
- 3) Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. J Clin Microbiol. 40(12): 4744-7.
  - 4) Kergourlay G, Messaoudi S, Dousset X, Prévost H. 2012. Genome sequence of *Lactobacillus salivarius* SMXD51, a potential probiotic strain isolated from chicken cecum, showing anti-*Campylobacter* activity. J Bacteriol. 194(11):3008-9.
  - 5) Jayaraman S, Thangavel G, Kurian H, Mani R, Mukkalil R, Chirakkal H. 2013. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. Poult Sci. 92(2):370-4.
  - 6) Mohan V. 2015. The role of probiotics in the inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization and virulence attenuation. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 34(8): 1503-13.
  - 7) Robyn J, Rasschaert G, Messens W, Pasmans F, Heyndrickx M. 2012. Screening for lactic acid bacteria capable of inhibiting *Campylobacter jejuni* in *in vitro* simulations of the broiler chicken caecal environment. Benef Microbes. 3(4): 299-308.
  - 8) Nishiyama K, Nakazato A, Ueno S, Seto Y, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T. 2015. Cell surface-associated aggregation-promoting factor from *Lactobacillus gasserii* SBT2055 facilitates host colonization and competitive exclusion of *Campylobacter jejuni*. Mol Microbiol. 98(4):712-6.
  - 9) Neal-McKinney JM, Lu X, Duong T, Larson CL, Call DR, Shah DH, Konkel ME. 2012. Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. PLoS One. 7(9): e43928.
  - 10) Hermans D, Van Deun K, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Rasschaert G, Heyndrickx M, Pasmans F. 2011. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. Vet Microbiol. 152(3-4): 219-28.
  - 11) Scupham AJ, Jones JA, Rettedal EA, Weber TE. 2010. Antibiotic manipulation of intestinal microbiota to identify microbes associated with *Campylobacter jejuni* exclusion in poultry. Appl Environ Microbiol. 76: 8026-32.
  - 12) Ganan M, Martinez-Rodriguez AJ, Carrascosa AV, Vesterlund S, Salminen S, Satokari R. 2013. Interaction of *Campylobacter* spp. and human probiotics in chicken intestinal mucus. Zoonoses Public Health. 60(2): 141-8.
  - 13) 中島智子、星野桃子、浅井紀夫、杉浦伸明、山本京子、足立由佳里、岡本裕行、柳瀬杉夫. 2010. 食鳥処理施設から分離した *Campylobacter jejuni* の性状解析. 京都府保環研年報. 2010: 25-9.
  - 14) Park SH, Dowd SE, McReynolds JL, Byrd JA, Nisbet DJ, Ricke SC. Evaluation of feed grade sodium bisulfate impact on gastrointestinal tract microbiota ecology in broilers via a pyrosequencing platform. Poult Sci. 2015. 94(12): 3040-7.
  - 15) Sakamoto M, Lapidus AL, Han J, Trong S, Haynes M, Reddy TB, Mikhailova N, Huntemann M, Pati A, Ivanova NN, Pukall R, Markowitz VM, Woyke T, Klenk HP, Kyrpides NC, Ohkuma M. High quality draft genome sequence of *Bacteroides barnesiae* type strain BL2(T) (DSM 18169(T)) from chicken caecum. Stand Genomic Sci. 2015. 10: 48.
  - 16) Gong J, Si W, Forster RJ, Huang R, Yu H, Yin Y, Yang C, Han Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. FEMS Microbiol Ecol. 2007. 59: 147-57.

表 1. オリゴヌクレオチドプライマー配列

Primer	Size(bp)	Sequence(5'-3')	Accession No	Target gene	Location(bp)
CJF	323	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	Z36940	<i>C. jejuni hipO</i>	1662-1681
CJR		GCCACAACAAGTAAAGAAGC			1984-1965
CCF	126	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	AF136494	<i>C. coli glyA</i>	337-357
CCR		TCCAGCAATGTGTGCAATG			462-444
23SF	650	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG	Z29326	<i>23SrRNA</i>	3807-3829
23SR		ATCAATTAACCTTCGAGCACCG			4456-4435

表 2. 農場別の分離培養成績

農場	有薬・無薬 の別	日齢	検体 数	陽性数 (陽性率)	分離菌種
A 農場	有薬	50 日齢	10	3 (30%)	<i>C. jejuni</i>
A 農場	無薬	50 日齢	10	8 (80%)	<i>C. jejuni</i>
B 農場	有薬	51 日齢	10	10 (100%)	<i>C. jejuni</i>
C 農場	有薬	18 日齢 (後期飼料切替 2 日後)	10	0 (0 %)	-
C 農場	有薬	28 日齢 (仕上飼料切替 3 日後)	10	0 (0 %)	-
C 農場	有薬	32 日齢 (仕上飼料切替 7 日後)	10	0 (0 %)	-
C 農場	有薬	48 日齢 (出荷時)	10	0 (0 %)	-
D 農場	有薬	51 日齢	5	3(60%)	<i>C. jejuni</i>
E 農場	有薬	51 日齢	5	4(80%)	<i>C. jejuni</i>
F 農場	有薬	52 日齢	5	0 (0 %)	-
G 農場	有薬	52 日齢	5	0 (0 %)	-

表 3. A・B 農場での分離成績と遺伝子型別

検体番号	農場	有薬・無薬 の別	日齢	検体数	陽性数 (陽性率)	分離菌種	遺伝子型
H1-H10	A 農場	有薬	50 日齢	10	3 (30%)	<i>C. jejuni</i>	ST-5255(1) ST-2274(2)
H11-H20	A 農場	無薬	50 日齢	10	8 (80%)	<i>C. jejuni</i>	ST-2274(8)
H28-H37	B 農場	有薬	51 日齢	10	10 (100%)	<i>C. jejuni</i>	ST-2274(10)

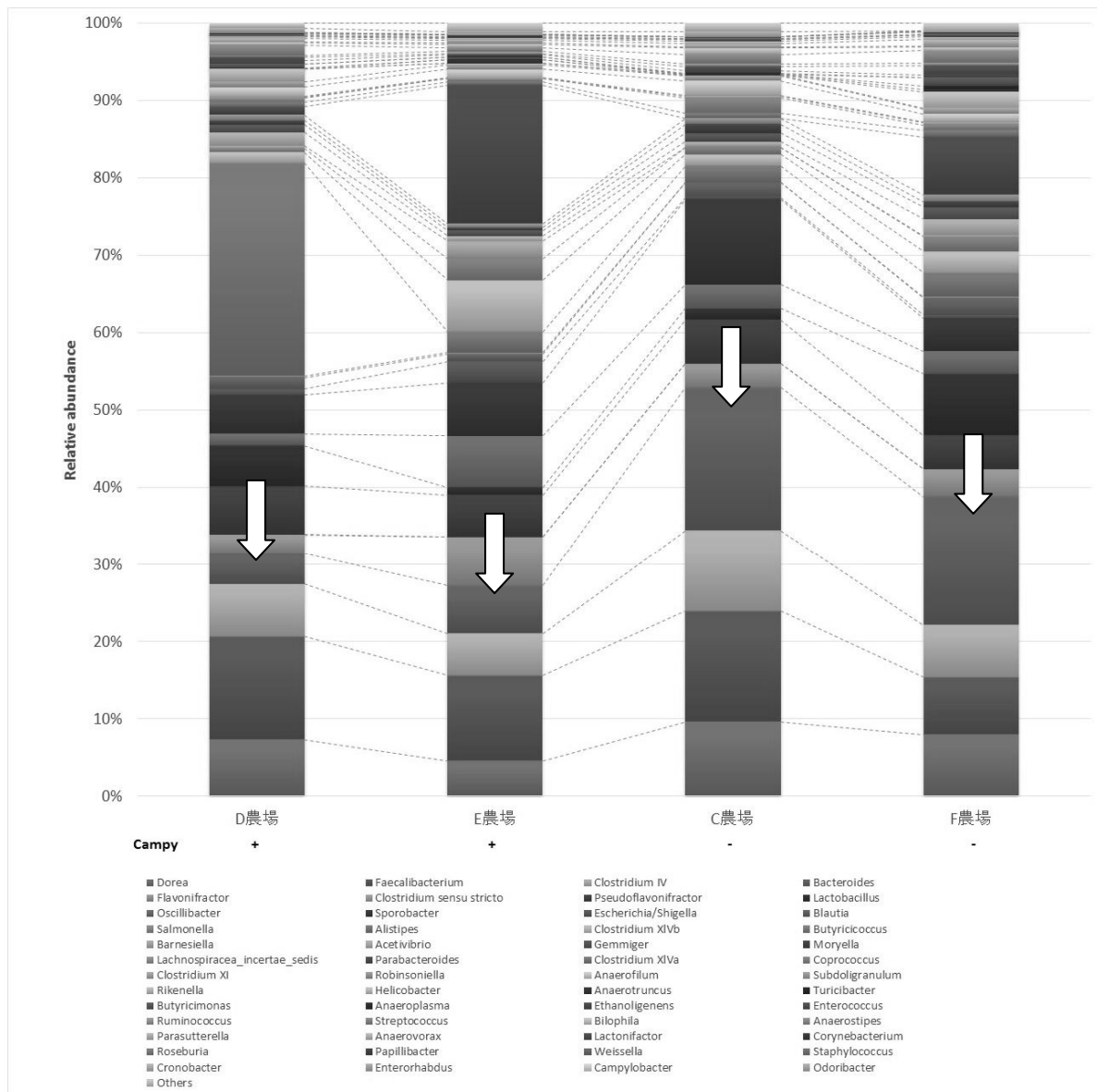


図 1. 出荷時肉用鶏の盲腸菌叢の農場別比較

D 農場・E 農場由来検体は、カンピロバクター陽性検体を、C・F 農場由来検体についてはカンピロバクター陰性検体を対象として、菌叢解析に供した。上図は、各農場につき 3 検体を無作為に抽出して得られた平均値を示す。矢印で示す枠は、*Bacteroides* 属を示す。

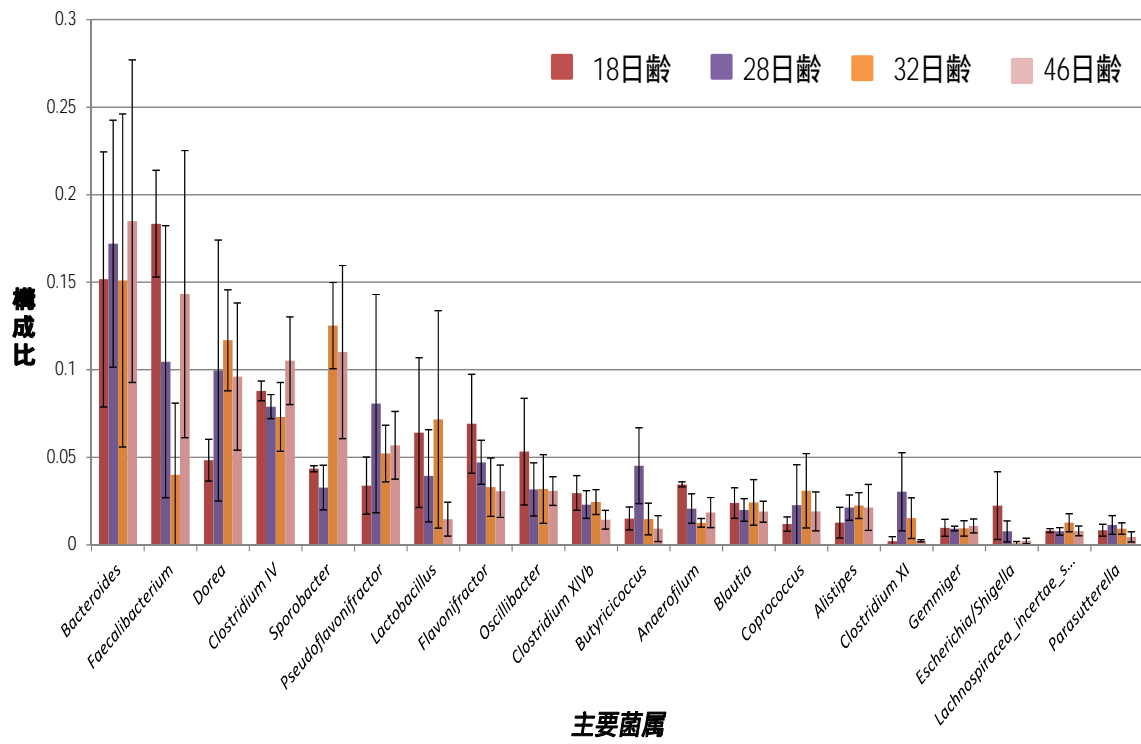


図2. C農場飼育ブロイラー鶏盲腸便構成菌叢の経時変動



食鳥肉におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究  
**食鳥処理現場での内臓摘出処理の情報収集とエアークラーク設置食鳥処理場について**

研究協力者 坂野智恵子 杉本治義 横田陽子 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
古茂田恵美子	東京家政大学
鈴木智之	滋賀県衛生科学センター
分担研究者 森田幸雄	東京家政大学

## 研究要旨

カンピロバクターは鶏肉から頻りに検出されることが知られており、鶏肉はカンピロバクター食中毒の主な感染源であることが指摘されている。そこで、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が多いこと、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 年当時と比べ格段に性能は向上していることが判明した。我が国で 2 施設しか設置されていないエアークラーク設置食鳥処理場の一つを訪問し聞き取りおよび見学を実施した。と体は塩素水槽に一度、手で漬けた後にエアークラーク処理を行っていた。

### A. 研究目的

2014年の我が国の食中毒発生件数は976件、食中毒患者数は19,355人である。主な病因物質別にみた細菌・ウイルス性食中毒事件数、患者数ともに第1位はカンピロバクター(306件、1,893人)、第2位はノロウイルス(293件、10,506人)であり、カンピロバクター及びノロウイルスによる食中毒は食品衛生上重要である。

カンピロバクター食中毒の主な原因はカンピロバクター汚染した鶏肉の喫食である<sup>1,2)</sup>。カンピロバクターは食鳥と体や市販鶏肉から高率に分離されており、その多くが*C. jejuni*であること<sup>1,2)</sup>、*C. jejuni*は冷蔵庫内でも長期間生存すること<sup>3)</sup>、比較的少量の菌量の摂取でも食中毒を発症すること<sup>4)</sup>、そして食中毒のみならず、食中毒症状の回復後にギランバレー症候群(末梢神経麻痺性疾患)を

発症する事例もあること<sup>5)</sup>等から食品衛生上のみならず医学的にも注視されている。

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<sup>6,7,8)</sup>。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クラーク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。

## 引用文献

- 1) Ono, K.; Yamamoto, K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama. Int. J. Food Microbiol. 1999, vol.47, p.211-219.
- 2) 清水泰美, 星野利得, 石岡大成, 森田幸雄, 黒田 晃, 花岡康夫. 食鳥処理場における細菌汚染調査. 日獣会誌. 1998, vol.51, p.608-612
- 3) Lee, A. Smith, S. C. Coloe, P. J. Survival and Growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. J. Food Prot. 1998, vol.61, p.1609-1614.
- 4) Black, R. E. Levine, M. M. Clements, M. L., Hughes, T. P. Blaser, M. J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. J. Infect. Dis. 1988, vol.157, p.472-479.
- 5) Dingle, K. E. Van Den Braak, N. Collins, F. M. Price, L. J. Woodward, D. L. Rodgers, F. G. Endtz, H. P. Van Belkum, A. Maiden, M. C. Sequence Typing Confirms that *Campylobacter jejuni* Strains Associated with Guillain-Barré and Miller-Fisher Syndromes Are of Diverse Genetic Lineage, Serotype, and Flagella Type. J. Clin. Microbiol. 2001, vol. 39, p.3346-3349.
- 6) 鶏病研究会. 生産現場におけるカンピロバクター汚染実態とその対策. 鶏病研報, 2001, vol. 37(4), p. 195-216.
- 7) 高木昌美. 鶏におけるカンピロバクター汚染. 鶏病研報, 2002, vol. 38S, p.25-34.
- 8) 食品安全委員会通知府食第 596 号, 平成 21 年 6 月 25 日, カンピロバクター・ジェジュニ/コリの食品健康影響評価の結果  
[http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyo2-campylobacter\\_k\\_n.pdf](http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyo2-campylobacter_k_n.pdf)

## B. 研究方法

### 1. 鶏の内臓摘出処理機器メーカーへの聞き取り調査等

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(ストーク社を主力に輸入・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。

### 3. 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。

## C. 研究結果

### 1. 鶏の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。食鳥検査から 24 年間は過ぎた今日、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であったものに異なるメーカーの機器が処理工程ごとに設置されることが多くなった。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の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。処理される鶏の大きさが均一であれば、内臓摘出時の腸の破損が無い処理も可能であった(写真 1)。

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が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 社単独の処理機器であった。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 2-1 ~ 8 に示した。

## 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とのことであった。

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。

## D. 考察

### 1. 鶏の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である。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<sup>9)</sup>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。

## 引用文献

9) Demirok E, Veluz G, Stuyvenberg WV, Castañeda MP, Byrd A, Alvarado CZ. Quality and safety of broiler meat in various chilling systems. *Poult Sci.* 2013 Apr;92(4):1117-1126

## E. 結論

我が国に導入されている食鳥処理機器は世界で流通しているメーカーであり、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。

エアークララーはと体のカンピロバクター汚染の軽減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、微生物学的検査をより実施し、その効果を科学的に証明する必要があると思われた。

## **F. 研究発表**

### **1. 論文発表等**

なし

### **2. 学会等発表**

なし

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

### **1. 特許取得**

なし

### **2. 実用新案登録**

なし



写真1 良好な内臓摘出状況



写真2-1 我が国には導入されていないBAYLE社製内臓摘出装置



写真2-2 管理室に設置されている監視カメラのディスプレイ

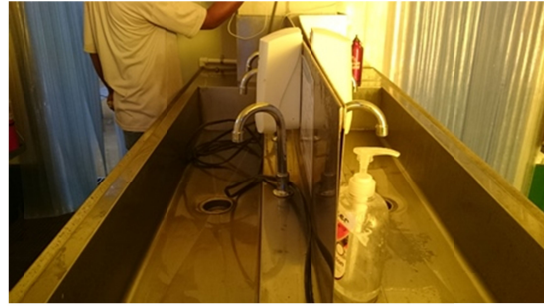


写真2-3 処理室・入室の前の手洗い装置

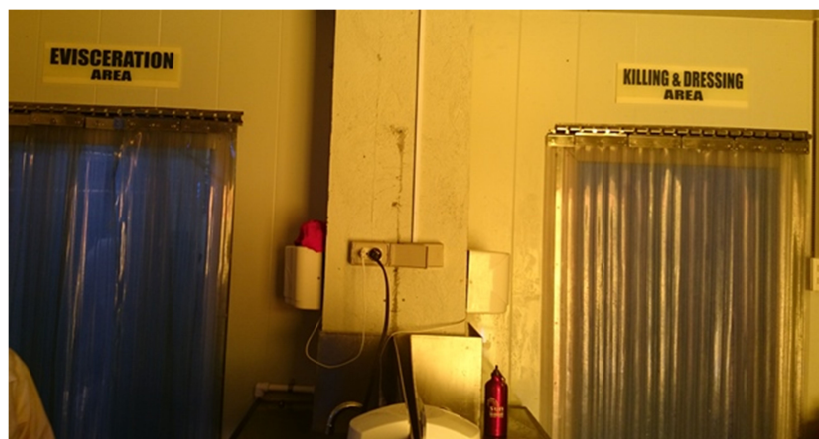


写真2-4 左は内臓摘出エリアへの入り口、右はと鳥エリアへの入り口



写真2-5 チラー槽およびと体解体室



写真2-6 グローブが汚れた時に  
浸す消毒槽(塩素濃度100ppm)



写真2-7 と鳥の汚れが目視された時  
に、と鳥を浸す消毒槽  
(塩素濃度100ppm)



写真2-8 ホースラックに巻かれた  
ホース、床と壁の接触場所はR構造、  
床は緩やかな傾斜で水たまりはない



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）

「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

## 応用的冷凍処理による鶏肉中のカンピロバクター汚染制御に関する研究

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	吉村昌徳	日本冷凍食品検査協会関西事業所
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	橘 理人	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、実用的冷凍処理法を通じた鶏肉中のカンピロバクター汚染低減効果に関する知見を得るため、食鳥肉加工施設において既設されるクラストフリーズ装置および、馬肉をはじめとした多様な食品の冷凍処理に汎用される、急速液体冷凍装置を用いた際の、鶏肉中カンピロバクター菌数を定量的に求めた。急速液体冷凍装置を用いた冷凍処理を通じ、鶏肉検体温度は急速な低下を示し、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対数個となった。蛍光染色法による生死判定結果より、短時間での処理に伴う上述の生存挙動は損傷菌あるいはVBNC状態移行とは関連性が低く、確実な低減効果を有することが示された。食鳥肉加工施設計2施設に既設のクラストフリーズ装置を用いた検討成績として、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。以上の成績は、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いえよう。その処理時間については、装置別に考慮する必要があると思われるが、本研究における成績からは短時間処理であっても一定の低減効果が示されたことから、より広い施設での検証作業が必要と考えられる。

### A. 研究目的

カンピロバクター属菌は微好気性・グラム陰性のらせん状菌であり、ヒトの下痢原性病原細菌として広く知られている。本属菌はこれまでに17菌種6亜門3生物型に分類されている。このうち、ヒトの下痢症と最も関連性が高いのはカンピロバクター・ジェジュニ/コリであり、我が国では1982年に食中毒細菌に指定されている<sup>1)</sup>。厚生労働省・食中毒統計によると、カンピロバクター・ジェジュニ/コリによる食中毒は、近年わが国で発生する細菌性食中毒の中で

発生件数が最も多い傾向が近年続いている<sup>2)</sup>。本菌による食中毒の特徴としては、散发事例の割合が多い他、1-7日とやや長い潜伏期間を経た後に下痢、腹痛、発熱、悪心、嘔吐、頭痛、倦怠感等の臨床症状を呈すること等が挙げられる。また、神経変性症の一種であるギランバレー症候群（GBS）との疫学的関連性も指摘されており<sup>1)</sup>、本菌の感染制御へとつながる食品の衛生管理の充実は、広く公衆衛生の向上を図る上で、必要不可欠な課題ともいえる。

分子疫学研究の進展に伴い、英国や米国

における本食中毒の原因食品としては、鶏肉が最も高い比率で介在することが明らかになりつつある<sup>3,4)</sup>。わが国においても、鶏肉はカンピロバクター食中毒の主な原因食品と目される知見が集積されている現状<sup>5)</sup>を背景として、鶏肉における本菌の汚染制御が今後一層重要な課題として必要と考えられる。

本菌は、鶏や牛などの家禽や家畜の腸管内に広く分布しているが<sup>1)</sup>、これらの動物に対して病原性を示さない常在菌と位置づけられる。当該動物における本菌定着は、従って生産に及ぼす影響も無視できるほど小さいため、家畜・家禽生産段階における本菌の制御対策は未だに実施困難な状況にある。また、食鳥処理の段階においては、処理羽数が膨大であることから、迅速性が求められており、個体単位での交差汚染防止等の衛生対策は現状では困難な課題の一つと位置付けられる。本課題の解決に向けた、ソフト・ハード両面からのカンピロバクター汚染防除策については、種々の検討がなされているが、未だに開発途上にある<sup>15)</sup>。そのため、食鳥肉の生産・食鳥処理・加工・流通・消費（調理・喫食）過程といったフードチェーンを通じた総合的な制御対策が本食中毒低減を図る上での最重要課題となっている。

わが国では、食品安全委員会により、2009年に鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリに関する食品健康影響評価書が策定され、各段階での対策案の例示とともに、各手法による汚染リスク低減効果の評価がなされている<sup>6)</sup>。食鳥処理過程における対策例としては、汚染鶏・非汚染鶏の区分処理（予想低減率 44.0%）や冷却水の塩素濃度管理の徹底（同 21.4%）などが交差汚染の低減に資するものとして挙げられている。一方、国内における食鳥肉生産の管理体制上、前者の実行性は乏しく、現実的な対策としては成立しがたい状況にある。また、その下流にあたる調理・喫食段階での対策例としては、一般的な交差汚染の防止に加え、加熱の徹底（生食あるいは加熱不十分な調理の回避）が汚染リスク回避の有効な手段として挙げられており、リスクコミュニケーション活動を通じて、十分な加熱の必要性が消費者に啓発されるべきと思われる

る。しかしながら、わが国や韓国などの一部の国・地域では、食鳥肉の生食が食習慣として根付いており、生食用として提供される食鳥肉に対しても一定の対策を検討する必要性が議論されているところである。

食鳥肉の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を得ており<sup>7,8,9)</sup>、これら3ヶ国では、農場から食卓に至るフードチェーン全体を通じた総合的な対策を講じている。

アイスランドでは、農場での汚染確認を鶏群単位で経時的に実施しており、汚染が認められる、あるいは汚染が過去2代に渡って認められた鶏群に対しては、食鳥処理後に冷凍を義務付けることが定められている。同国では消費者が、冷凍・非冷凍といった流通形態の違いから、汚染肉かどうかの判断が容易になっていることに加え、リスクコミュニケーション活動を持続的に行う等の対策がとられている<sup>6)</sup>。国内における鶏群のカンピロバクター汚染実態を把握し、生産から消費の各過程における諸対策の構築・実施は、こうした海外と同様に、本食中毒の低減に資することが期待される。国内での食中毒対策における冷凍処理法として、馬肉の流通にあたっては、平成23年6月に厚生労働省より、-20（中心温度）で48時間以上、-30（中心温度）で36時間以上、-40（中心温度）で18時間以上および急速冷凍装置を用いた場合には、-30（中心温度）で18時間以上を保持する冷凍方法、ならびに液体窒素に浸す場合にあっては、1時間以上保持する方法の導入が寄生虫制御を目的として通知された<sup>10)</sup>。

以上のように、冷凍処理が海外3ヶ国において既に導入・運営されていること<sup>7,8,9)</sup>、そして、国内における馬肉の流通では寄生虫汚染制御のための対策として冷凍処理法が通知・運用されている実態<sup>10)</sup>を踏まえ、本研究では、緩慢冷凍および急速液体冷凍処理を行った際の鶏肉中のカンピロバクター生存挙動に関する検討を行い、有効性ならびに実用性の両面から、鶏肉の冷凍処理の在り方に関して考察を行った。また、一定規模以上の国内食鳥肉加工施設において



既に稼働している、トンネルフリーザー(クラストフリーザー)の有効性に関しても併せて検討を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 鶏モモ肉検体の温度測定

鶏モモ肉検体(25g)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(図1A)。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(記憶計 for Windows Ver.6.2)に出力することで数値を求めた。

### 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25g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した後、-35℃に予冷した急速液体冷凍機に浸漬および-20℃の空冷・冷凍庫内に入庫した。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25g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、EasySpiral(InterScience)を用いて、同液100μlをバンコマイシン(和光純薬工業)10μg/ml、テトラサイクリン(和光純薬工業)20μl/ml、パシトラシン(和光純薬工業)10μl/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うえで、カンピロバクターと疑われる定型的集落については、DrySpot(Oxoid)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PBS10ml中での本菌生存挙動の検討にあたっては、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

検体の数値は冷凍前検体からの回収菌数を指すこととした。

### 3. BacLight 染色法を用いたカンピロバクター・ジェジュニ生存菌数の測定

H0103株(冷凍弱耐性株)およびH0105株(冷凍強耐性株)をMHA中で16時間、37℃で微好気培養を行い、各菌株をPBS1mlに約5対数個/mlとなるよう添加した後、速やかに急速液体冷凍機で冷凍保存した。0, 3, 6, 24 および 48 時間冷凍保存後、各3検体を流水で1分間融解させ、LIVE/DEAD®BacLight™Bacterial Viability Kit(Thermo Scientific)を指示書に従って用いた。染色後検体は、蛍光顕微鏡(OLYMPUS)下での観察を通じて、各検体での「緑色蛍光群/(緑色蛍光群+赤色蛍光群)」より生存菌数を求めた後、冷凍処理0時間目検体における生存菌数を100%と仮定したうえで、各検体の生存率を算出した。なお、同検討により算出した生存率を膜安定率と指すこととした。

### 4. 自然汚染丸鶏のカンピロバクター汚染菌数の測定

市販の中抜き丸鶏(1.2~1.4kg)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300ml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3ml、300μl、30μlを10mlのプレストンブロス(プチットカンピロ/10、ニッセイバイオ)に3本ずつ加え、42℃で48時間微好気培養した。同培養液1mlを採取し、シカジーニアスDNA抽出試薬(関東化学)を用い、鋳型DNAを抽出した。PCR法にあたっては、GoTaq PCR master mix(Promega)を指示書に従って用い、カンピロバクター・ジェジュニ/コリの定性検出を行った。この際のフォワードプライマーとして、CJF(5'-ACTTCTTTATTGCTTGCTGC-3')およびCCF(5'-GTAAAACCAAAGCTTATCGTG-3')を、リバースプライマーとして、CJR(5'-GCACAACAAGTAAAGAAGC-3')および

CCR(5'-TCCAGCAATGTGTGCAATG-3')を用いた。反応条件は95℃・6分で熱変性させた後、95℃・30秒、59℃・30秒、72℃・30秒を1サイクルとして30サイクル行った<sup>12)</sup>。この後、アガロースゲル電気泳動によって遺伝子増幅の有無を確認した。各検体の汚染菌数は最確数(MPN)法により求めた。

## 5. 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(OXOID)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℃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℃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2倍希釈懸濁液については、EasySpiral®(INTERSCIENCE)を用いて、100µlずつ標準寒天培地(OXOID)、VRBL寒天培地(OXOID)、VRBG寒天培地(OXOID)に塗布し、それぞれ35℃、44℃、35℃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。

## 6. 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。

## C. 結果

### 1. 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。急速液体冷凍装置(図 1A)を用いた場合の検体中心温度は、冷蔵状態(4.8℃)から 3分

10秒後には-20℃に、6分後には-30℃に到達した。一方、空冷冷凍庫を用いた緩慢冷凍処理を行った場合の検体中心温度は、冷蔵状態(4.8℃)から102分後によりやく-20℃に到達した(図 1B)。以上より、急速液体冷凍法では緩慢冷凍に比べ、-20℃到達時間が約32.2倍に短縮されるなど、より速やかな検体温度低下を誘導することが示された。

### 2. 急速液体冷凍処理及び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挙動

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℃)における経時的成績として、3, 6, 24, 48時間処理後の生存菌数平均値は、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、それぞれの時間軸における検体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対数個であった(図 2A および図 3A-E)。7.30-7.70対数個/gの各菌株を接種した、緩慢冷凍処理群(-20℃)での挙動を同様に観察したところ、3, 6, 24, 48時間処理後の生存菌数平均値は、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、各時間軸における検体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(図 2B および図 3A-E)。3時間処理後の両群間での生存菌数の比較により、急速液体冷凍処理群は緩慢冷凍処理群に比べて、H0101株を除き、何れも速やかなカンピロバクター菌数の減少を示した(*p*=0.0008-0.020)。H0103株およびH0105を除き、6時間処理後における両処理群間での有意差は何れの菌株においても認められた(*p*=0.0001-0.003)(図 3A-E)。一方、24時間および48時間処理を行った場合の両群間での有意差はそれぞれ3株(H0101, H0105, H0135)でのみ認められた(図 3A, D, E)。全5株を比較対象とした場合には、両群間の有意差は、6時間以降、認められ

なかった(図 3F)。

### 3. 急速液体冷凍処理に伴う、PBS および 10%ドリップ加 PBS 中におけるカンピロバクター・ジェジュニ生存挙動の比較

上述の成績より、鶏肉中での低減傾向は示すものの持続的な生存性保持が示されたこと、ならびに接種菌株間での生存挙動に差異が想定されたことを受け、食品マトリックスが顕す本菌の冷凍過程での生存性挙動に与える影響について知見を得ることを目的として、PBS および 10%ドリップ加 PBS 中での本菌生存挙動を検討することとした。各菌株について約 7 対数個/mL となるよう PBS もしくは 10%ドリップ加 PBS に添加し、上述と同様に冷凍処理工程における生存挙動を経時的に観察した。3, 6, 24, 48 時間処理後における PBS 中での生存菌数平均値は、4.80-5.84 対数個/g、4.50-5.46 対数個/g、3.46-4.49 対数個/g、2.68-4.00 対数個/g となり、それぞれの時間軸における検体 1g あたりの菌数低減値は、1.23-1.85 対数個、1.41-2.16 対数個、2.24-3.20 対数個、3.05-3.98 対数個であった(図 4A)。10%ドリップ加 PBS 中での計 5 株の生存菌数平均値は、冷凍 3, 6, 24, 48 時間後でそれぞれ 5.84-6.69 対数個/g、5.51-6.49 対数個/g、3.86-5.44 対数個/g、3.10-5.20 対数個/g となり、それぞれの時間軸における検体 1g あたりの菌数低減値は、0.44-1.00 対数個、0.63-1.33 対数個、1.69-2.99 対数個、1.93-3.75 対数個であった(図 4B)。

H0101 株および H0104 株では、それぞれ 1 時間軸においてのみ両群間で有意差を認めなかった(図 5A-E)ものの、全 5 株での比較としては、10%ドリップ加 PBS 中の生存菌数は PBS 中のそれに比べて、すべての時間軸において有意に高い値を示した( $p = 0.003$ ,  $p = 0.0002$ ,  $p = 0.020$ ,  $p = 0.035$ ) (図 5F)。以上より、カンピロバクター供試菌株の冷凍過程での生存挙動の変動には、鶏肉に含まれるマトリックス成分が保護作用をもって影響することが示された。

### 4. 急速液体冷凍処理に伴う、カンピロバクター・ジェジュニ膜安定性の検証

上記の試験結果より、供試菌株の中で H0103 株は冷凍弱耐性を示す一方、H0105 株

は冷凍強耐性を示す等、本菌の生存に関わる形質多様性が考えられた。当該形質の多様性は、本菌を含めた病原細菌の多くが環境ストレスを受けた際に顕す、損傷状態あるいは生きていないが培養できない(VBNC)状態等を生じる可能性が推察されたことから<sup>13,14)</sup>、本研究では次に上述の 2 株を用いて、急速液体冷凍処理に伴う、膜安定性挙動について評価することとした。BacLight 染色法を用いた検討により、3, 6, 24, 48 時間の同処理で、冷凍強耐性を示す H0105 株では、5.45%, 2.87%, 1.97%, 1.01% の膜安定性を示した。一方、冷凍弱耐性を示す H0103 株の膜安定性は 0.69%, 0.39%, 0.24%, 0.22% と低い値を示した(図 6)。3 時間および 6 時間処理においての両菌株間での膜安定性は、培養法に基づく生存菌数と同様に速やかな減少を示すことが明らかとなった。一方で、24 時間以上の同処理においては、損傷状態から回復する可能性も示された。

### 5. 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 2,094 MPN 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( $p = 0.13$ ) (図 7)。

### 6. 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 施設においては、食鳥処理直後に、クラストフリージング処理により、表面のみを急速冷凍させた(急速冷凍処理群)、またはチルド(10℃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場合の食鳥モモ肉(骨付き)を対象として、カンピロバクター及び衛生指標菌(A 施設検体については、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(Table 1)。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 0.11MPN count/g、0.16 MPN count/g、および 0.19MPN count/g であり、モモ及びレバーにおける菌数は 11.00MPN count/g 及び 3.10 MPN count/g であった(表 1)。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(表 1)。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(表 1)。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(表 1)。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(表 1)。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られた部位は砂肝のみであった(太字、表 1)。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(表 1)。

(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、クラストフリージング処理群で 0.080 MPN count/g となり、後者で有意に低い菌数が認められた(表 2)。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、クラストフリージング処理群で 4.23 対数個/g となった(表 2)。

以上の結果より、クラストフリージング

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、腸内細菌科菌群をはじめとした、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。

D. 考察

わが国と同様に米国においても、鶏肉中のカンピロバクター汚染に関しては、公衆衛生上、最も危害性の高い食品・病原体の組み合わせとして位置づけられており<sup>3)</sup>、鶏肉における本菌の汚染制御を目指す取り組みが必要不可欠な課題といえる。これに資する一手法として、本研究では、冷凍処理の在り方に関する知見の集積を目的として、急速液体冷凍装置を用いた鶏肉中での本菌挙動について諸検討を行った。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<sup>15,16,17)</sup>、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<sup>16,17)</sup>、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(図 2B)。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ているが<sup>18)</sup>、これらは緩慢冷凍処理を受けた後、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おり<sup>19)</sup>、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(図2および図3)。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を通じては、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(図4および図5)。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<sup>20)</sup>。本菌におけるバイオフィーム形成は、他の細菌と同様に、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、今後の検討課題として考える。

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(図7)。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。

以上のように、本研究では、カンピロバクター・ジェジュニによる鶏肉汚染を検討対象

として、添加回収試験を通じた、急速液体冷凍処理による本菌生存挙動に関する時系列データの収集を行った。膜安定性挙動評価を通じ、急速液体冷凍処理による本菌の速やかな生存性減少は、損傷状態によるものとも考え難く、確実に生存菌数の低減に資する手法であることが示された(図6)。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り、加工・流通段階における本菌汚染を低減する一手法として今後の応用が期待される。

## E. 結論

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、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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

・朝倉宏、山本詩織、橘理人、吉村昌徳、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．日本食品微生物学会雑誌．32(3)：159-166．

### 2. 学会発表

・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．

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## H. 引用文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター．カンピロバクター感染症．  
[http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k05/k05\\_19/k05\\_19.html](http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k05/k05_19/k05_19.html)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課．食中毒統計資料．  
[http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html)
- 3) Batz MB, Hoffmann S, Morris JG Jr. Ranking the disease burden of 14

- pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *J Food Prot.* 75: 1278–1291 (2012).
- 4) Sheppard SK, Dallas JF, Strachan NJ, MacRae M, McCarthy ND, Wilson DJ, Gormley FJ, Falush D, Ogden ID, Maiden MC, Forbes KJ.: *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clin Infect Dis.* 48: 1072–1078 (2009).
  - 5) Asakura H, Brüggemann H, Sheppard SK, Ekawa T, Meyer TF, Yamamoto S, Igimi S.: Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. *PLoS One.* 7: e48394 (2012).
  - 6) 内閣府食品安全委員会. 微生物・ウイルス評価書「鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ」(2009) .  
<https://www.fsc.go.jp/fscis/evaluation/Document/show/kya20041216001>
  - 7) Tustin J, Laberge K, Michel P, Reiersen J, Daðadóttir S, Briem H, Harðardóttir H, Kristinsson K, Gunnarsson E, Fridriksdóttir V, Georgsson F. A national epidemic of campylobacteriosis in Iceland, lessons learned. *Zoonoses Public Health.* 58: 440-447 (2011)
  - 8) Wingstrand A, Neimann J, Engberg J, Nielsen EM, Gerner-Smidt P, Wegener HC, Mølbak K.: Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 12: 280–285 (2006).
  - 9) Baker M1, Wilson N, Ikram R, Chambers S, Shoemack P, Cook G.: Regulation of chicken contamination is urgently needed to control New Zealand's serious campylobacteriosis epidemic. *NZ Med J.* 119: U2264 (2006).
  - 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長. 生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について . 平成 23 年 6 月 17 日 , 食安発 0617 第 3 号(2011) .  
[http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110617\\_02.pdf](http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110617_02.pdf)
  - 11) 百瀬愛佳 ,五十君静信. カンピロバクター「平成 25 年度食品の食中毒菌汚染実態調査における検査法(NIHSJ-02)」. 食品衛生検査指針微生物編 .pp. 312-315 . 公益社団法人日本食品衛生協会 (2015) .
  - 12) Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG.: Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*., *J Clin Microbiol.* 40: 4744-4747 (2002)
  - 13) Bronowski C, James CE, Winstanley C.: Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett.* 356: 8-19. (2014)
  - 14) Kassem II, Chandrashekar K, Rajashekara G. A relationship between viable but non-culturable cells formation and inorganic polyphosphate and formate metabolism in *Campylobacter jejuni*. *Front Microbiol.* 4: 183 (2013)
  - 15) Georgsson F, Thornorkelsson AE, Geirsdóttir M, Reiersen J, Stern NJ. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiol.* 23: 677–683 (2006).
  - 16) Rosenquist H, Sommer HM, Nielsen NL, and Christensen BB.: The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol.* 108: 226–232 (2006).
  - 17) Sandberg M, Hofshagen M, Østensvik Ø, Skjerve E, Innocent G. Survival of *Campylobacter* on frozen broiler carcasses as a function of time. *J Food Prot.* 68: 1600–1605 (2005).
  - 18) 農林水産省生産局畜産部食肉鶏卵課. 食肉鶏卵速報 .平成 27 年 3 月 (2015) .  
[http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/pdf/monthly\\_h27m3.p](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/pdf/monthly_h27m3.p)
  - 19) 小野一晃 , 辻 りえ , 安藤陽子 , 大塚

- 佳代子, 柴田 穰ら. 国産および輸入鶏肉におけるカンピロバクターの汚染状況. 日獣会誌. 56: 103-105 (2003).
- 20) Brown HL, Reuter M, Salt LJ, Cross KL, Betts RP, van Vliet AH. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol. 80: 7053-7060. (2014)

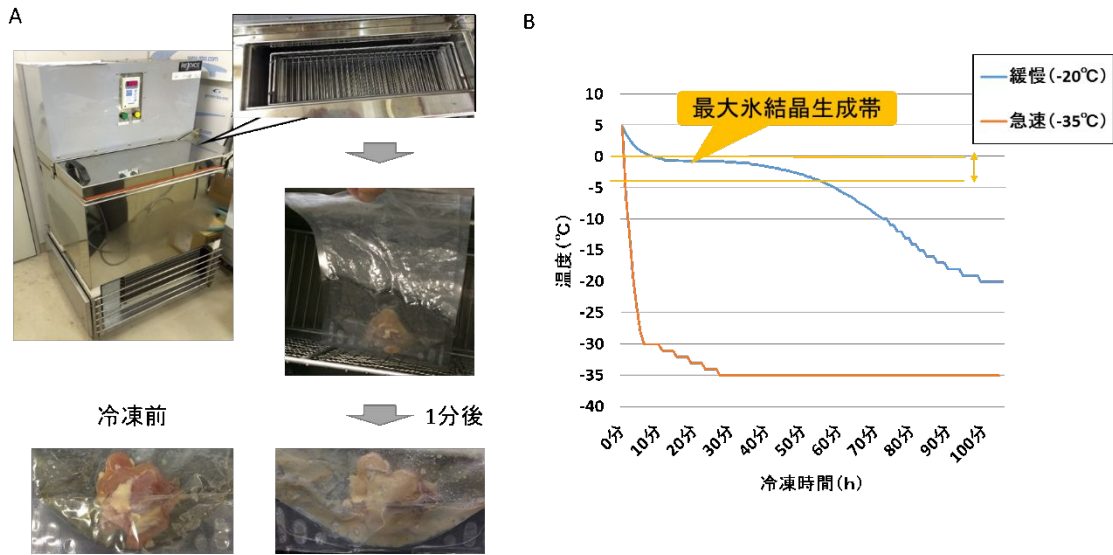


図1．急速液体冷凍機の外観・ワークフローおよび検体温度変化．  
 (A)本研究で使用した急速液体冷凍機の外観およびワークフロー．  
 (B)急速液体冷凍および緩慢冷凍における鶏モモ肉 25 g の温度変化の比較図．

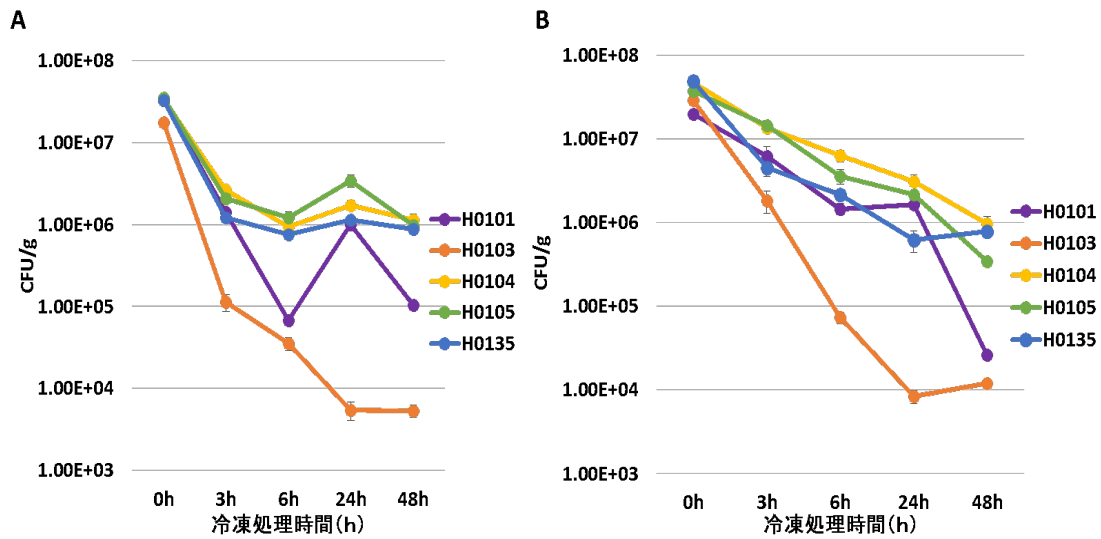
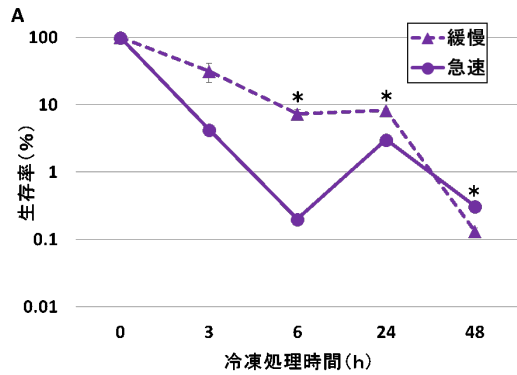
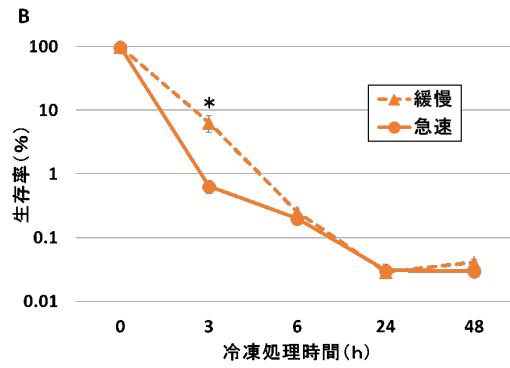


図2．急速液体冷凍処理 (A) あるいは緩慢冷凍処理 (B) に伴う、鶏モモ肉検体 25 g 中のカンピロバクター・ジェジュニ 5 株の生存挙動．

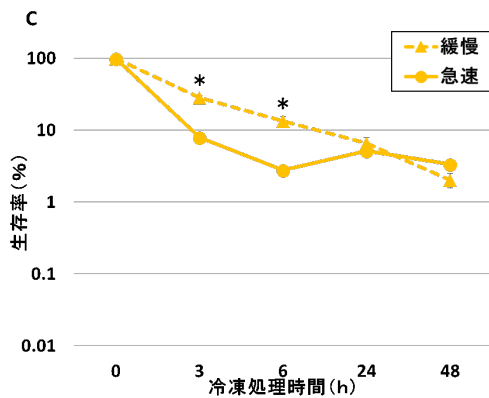




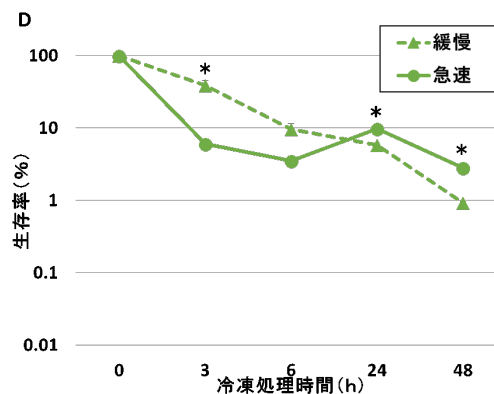
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.093$	$p=0.0001$	$p=0.005$	$p=0.008$



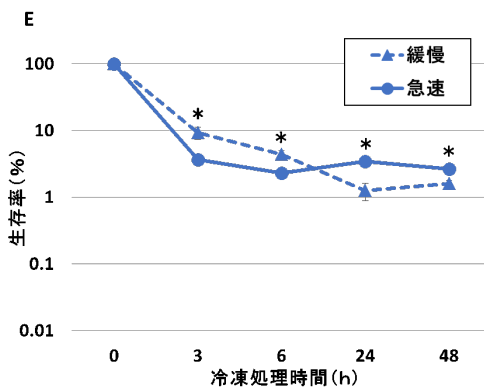
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.012$	$p=0.275$	$p=0.618$	$p=0.081$



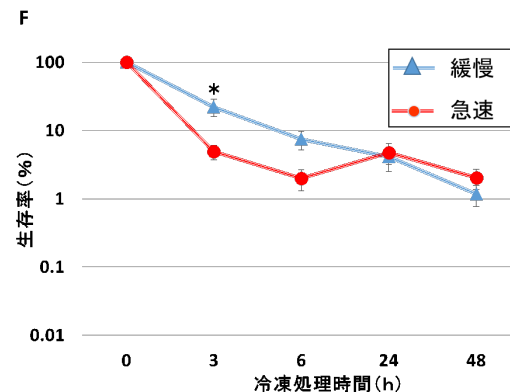
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.005$	$p=0.001$	$p=0.420$	$p=0.334$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.0008$	$p=0.068$	$p=0.018$	$p=0.008$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.020$	$p=0.003$	$p=0.035$	$p=0.025$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.003$	$p=0.057$	$p=0.958$	$p=0.181$

\*:  $P > 0.05$

図3. 急速液体冷凍処理および緩慢冷凍処理に伴う、鶏モモ肉中のカンピロバクター・ジェジュニの生存挙動. H0101株(A) H0103株(B) H0104株(C) H0105株(D) H0135株(E) および全5株平均(F)に係る生存挙動の比較を示す. なお、各数値は、冷凍処理0日目を生存率100%と仮定したうえで、各検体の生存率を算出している.

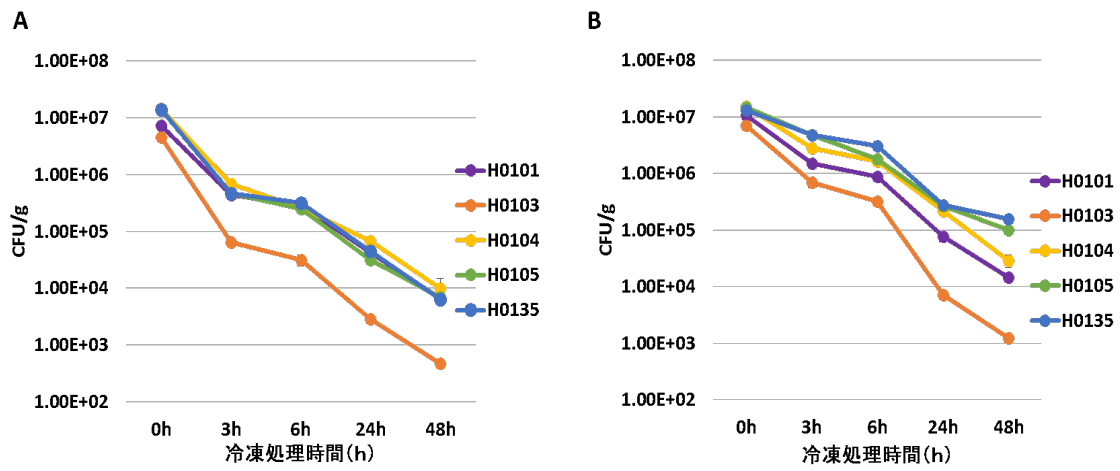
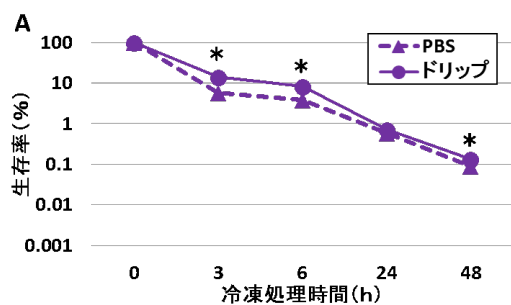
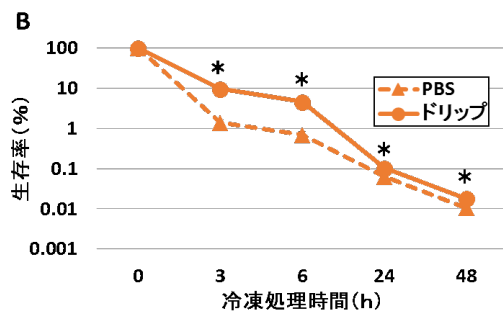


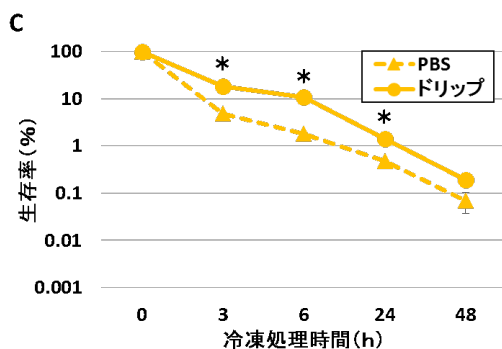
図 4 . 急速液体冷凍処理に伴う、PBS (A) あるいは 10% ドリップ加 PBS (B) 中でのカンピロバクター・ジェジュニ 5 株の生存挙動 .



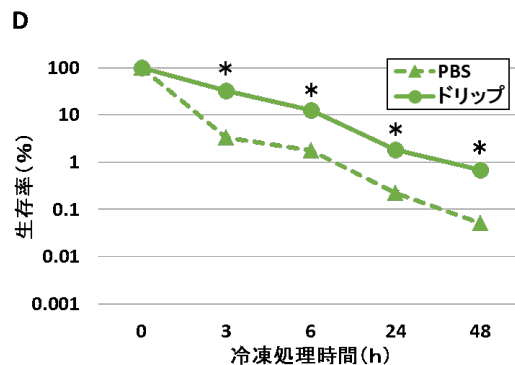
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.0003$	$p=0.00004$	$p=0.2985$	$p=0.0023$



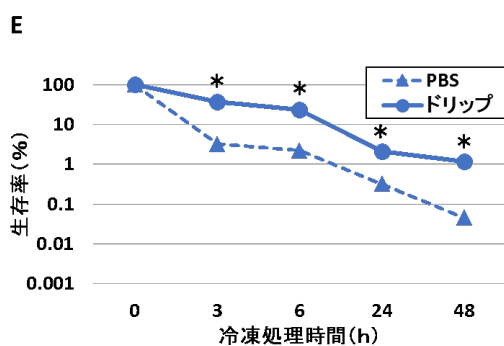
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.0004$	$p=0.0001$	$p=0.0024$	$p=0.0002$



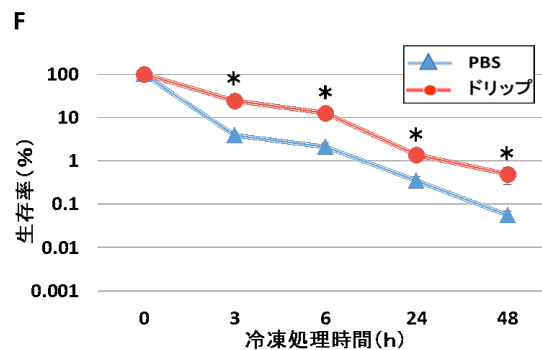
冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.00005$	$p=0.00001$	$p=0.00005$	$p=0.062$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.0026$	$p=0.0002$	$p=0.00006$	$p=0.00001$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.00001$	$p=0.002$	$p=0.00001$	$p=0.00001$



冷凍処理時間(h)	3時間	6時間	24時間	48時間
t検定	$p=0.003$	$p=0.002$	$p=0.020$	$p=0.035$

\*:  $P > 0.05$

図5. 急速液体冷凍処理に伴う、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) あるいは 10% ドリップ加 PBS (ドリップ) 中でのカンピロバクター・ジェジュニの生存挙動. H0101 株 (A) H0103 株 (B) H0104 株 (C) H0105 株 (D) H0135 株 (E) および 5 株平均 (F) に係る生存挙動の比較を示す. なお、各数値は冷凍処理 0 日目を生存率 100% と仮定したうえで、各検体の生存率を算出している.

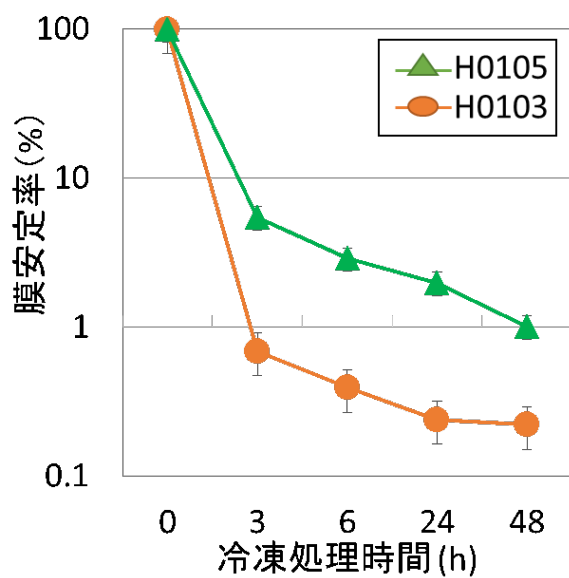


図6 . 急速液体冷凍処理に伴う，PBS 中でのカンピロバクター・ジェジュニ代表株（H0103 および H0105 株）の膜安定性挙動．

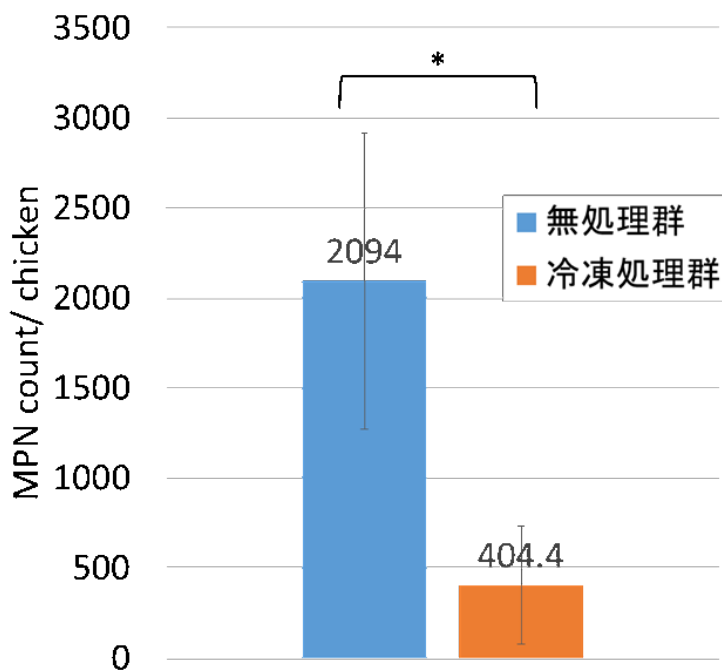


図7 . 急速液体冷凍処理（3h）に伴う、丸鶏自然汚染カンピロバクター菌数の変動．

表1．クラストフリージングによる食鳥部分肉中の自然汚染カンピロバクター低減効果（A社）

部位	処理 <sup>*1</sup>	カンピロバクター (MPN count/g)	指標菌数 (CFU/g)		
			生菌数	大腸菌群数	腸内細菌科菌群数
モモ	チルド	11.00	6.0.E+04	2.6.E+04	1.8.E+04
	冷凍	11.00	7.8.E+04	2.7.E+04	2.0.E+04
ムネ	チルド	0.68	2.4.E+04	1.0.E+04	9.3.E+03
	冷凍	0.11	7.1.E+03	4.0.E+03	2.4.E+03
ササミ	チルド	0.27	6.0.E+03	6.3.E+02	2.2.E+02
	冷凍	0.19	6.0.E+02	8.3.E+01	1.2.E+02
レバー	チルド	11.00	2.8.E+04	3.2.E+04	2.3.E+04
	冷凍	3.10	2.8.E+03	1.5.E+03	1.7.E+03
砂肝	チルド	11.00	<b>4.6.E+03<sup>*2</sup></b>	<b>1.8.E+03</b>	1.1.E+03
	冷凍	0.16	<b>5.8.E+02</b>	<b>3.7.E+02</b>	1.2.E+02

A社において生産・加工される種々の食鳥部分肉（同一ロット）を対象として、クラストフリージング処理によるカンピロバクター菌数及び指標菌数の変動について検討した。

\*1 チルド，-2~2°C；冷凍，クラストフリージング，<-15°C。

\*3 チルド処理群・クラストフリージング処理群間で有意差（p<0.05）を認めた数値を太字で記す。

表2．クラストフリージングによる食鳥部分肉中の自然汚染カンピロバクター低減効果（B社）

処理群 <sup>*1</sup>	検体 番号	カンピロバクター菌数(MPN count/g)		指標菌数(CFU/g)			
		数値	群内平均値	生菌数(群内平均値)		腸内細菌科菌群数(群内平均値)	
チルド処理群	1	0.46	0.646	7.56E+04	2.88E+04	1.00E+03	1.38E+03
	2	0.3		1.69E+04		1.70E+03	
	3	0.15		1.48E+04		8.00E+02	
	4	0.46		1.21E+04		1.30E+03	
	5	1.86		2.46E+04		2.10E+03	
クラストフリージング 処理群	6	0.06	0.080	9.20E+03	1.68E+04	9.00E+02	3.04E+03
	7	0.15		2.21E+04		3.80E+03	
	8	0.06		1.14E+04		1.20E+03	
	9	0.072		1.12E+04		3.60E+03	
	10	0.06		3.01E+04		5.70E+03	

B社において生産・加工される同一ロットの食鳥モモ肉を対象として、クラストフリージング処理によるカンピロバクター菌数及び指標菌数の変動について検討した。

\*1 チルド処理，-2~2°C；クラストフリージング処理，<-23℃・5分間



## 食鳥肉のカンピロバクターのリスク管理に関する研究 生食用として流通する食鳥肉の汚染実態調査

研究分担者 中馬猛久 鹿児島大学共同獣医学部

### 研究要旨

鹿児島県や宮崎県では鶏肉を生で供する鶏刺しが郷土料理として広く普及しており、飲食店で提供されるだけでなく一般的な小売店でも市販されているが、鶏刺しのカンピロバクター汚染率やそれを原因とする食中毒発生状況などを明らかにした基礎的データはない。本研究では、鶏刺しを含む生食用、加熱用それぞれの市販鶏肉のカンピロバクター汚染状況を明らかにすることを目的とした。鹿児島県内小売店にて購入した生食用鶏肉、加熱用鶏肉を材料とし、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カンピロバクター汚染度は有意に低いことがわかった。生食用鶏肉において推定される菌数は最大 36 MPN/50g であった。カンピロバクター症の発症には一般に数百個の菌の摂取が必要であるとされており、生食用鶏肉によるカンピロバクター症の発症の可能性は低いと考えられた。このことから、県内小売店にて市販される生食用鶏肉はカンピロバクターの汚染を回避、あるいは低下させることができていると推察された。

### A. 研究目的

近年、牛肉や豚肉の生食に関する問題が話題となっている。平成24年7月からは牛レバーの生食用としての提供、販売が禁止され、平成27年6月からはレバーを含めた豚肉の生食用としての販売、提供が禁止されている。これらの法改正は、牛については腸管出血性大腸菌、豚肉についてはE型肝炎ウイルスといった公衆衛生上のリスクの高い危害要因の存在が理由として挙げられている。こういった流れから、カンピロバクター感染のリスクの高い鶏肉の生食への関心も高まっていると考えられる。

鹿児島県や宮崎県といった南部九州地方では、昔から鶏肉を生で食す鶏刺しが郷土料理として存在しており、一般に食される文化がある。南部九州地方では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部でも提供を行う居酒屋が多く存在する。鶏刺しは鶏のもも肉、むね肉、ささみといった部位を用い、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、実際に鶏刺しが原因であると特定される事件は多くない。また、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ほとんどなく、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

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 検体の計検体である。購入した鶏肉については日付、品名、販売店、加工会社の記録をした後、購入日中に試験に供した。

本研究では、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、ストマック

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. 研究結果

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。

(図 1)

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

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。

2. 実用新案登録  
なし

## E. 結論

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或は湯引きによる低減効果の検証が必要と考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表等

無し

### 2. 学会等発表

・「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)

・「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(京都市)

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

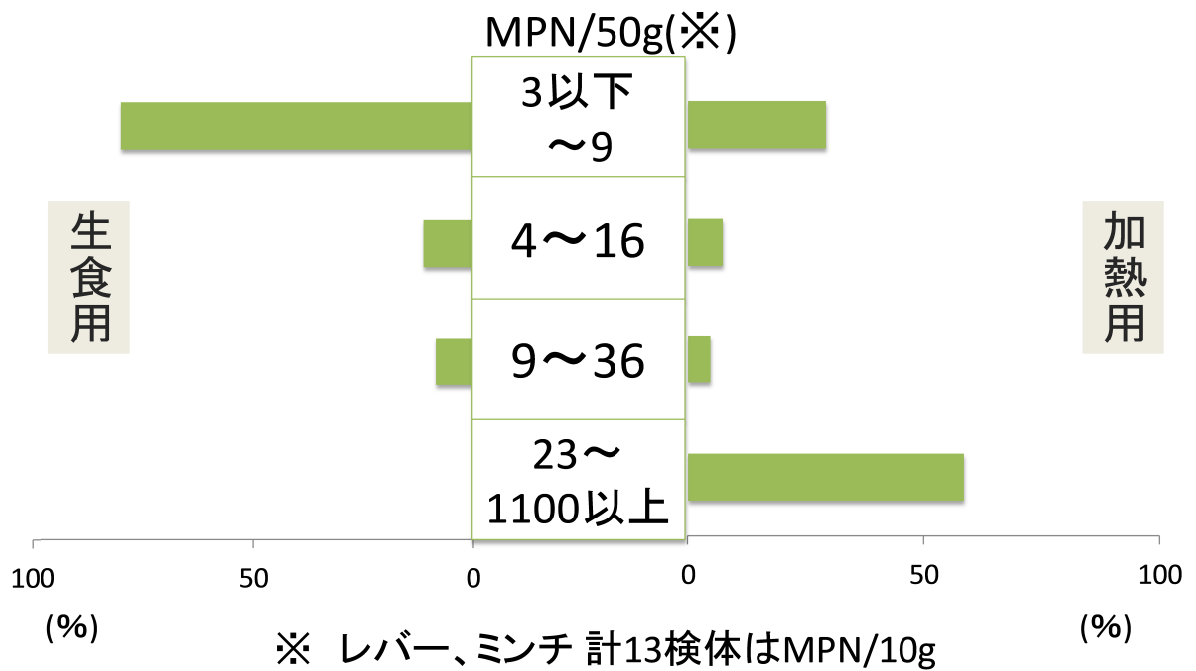


図1. 各鶏肉におけるカンピロバクター汚染度の比較

表1. 各鶏肉のカンピロバクター分離状況.

鶏肉	検体数	3本中のカンピロバクター陽性数			
		0	1	2	3
生食用	35	28	4	3	0
加熱用	41	12	3	2	24
合計	76	40	7	5	24

表2. 分離されたカンピロバクターの同定.

鶏肉	検体数	陽性数	菌種	
			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
生食用	35	7	6	1
加熱用	41	29	25	4

表 3. 生食用鶏肉の加工会社による比較.

	検体数	3本中のカンピロバクター陽性数			
		0	1	2	3
A社	14	12	2	0	0
B社	11	9	1	1	0
その他	10	7	1	2	0
合計	35	28	4	3	0

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
朝倉宏、山本詩織、橘理人、吉村昌徳、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 .	日本食品微生物学会雑誌	32	159-166	2015
Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S.	Ex vivo proteomics of <i>Campylobacter jejuni</i> 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut.	Res Microbiol.	167	63-71	2016