

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 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏

平成 29 (2017) 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 29 (2017) 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

鶏盲腸菌叢が顕すカンピロバクター制御効果に関する研究

山本 茂貴、朝倉 宏 他

19

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

食鳥処理方式による鶏肉の汚染状況について

森田 幸雄

29

海外の食鳥処理施設における衛生管理に関する情報収集

朝倉 宏 他

35

生食用食鳥肉の解体加工施設における衛生管理に関する研究

朝倉 宏、中馬 猛久 他

47

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

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

朝倉 宏 他

51

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

61

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

69

平成 28 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（平成 28 年 12 月まで）

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 東京農業大学

猪子 理絵 北海道帯広食肉衛生検査所

猪俣 生輝 鹿児島県保健福祉部生活衛生課

鹿島 正文 鹿児島県保健福祉部生活衛生課

川瀬 遵 島根県食肉衛生検査所

川本 恵子 帯広畜産大学

窪田 邦宏 国立医薬品食品衛生研究所

熊谷 優子 国立感染症研究所

倉園 久生 帯広畜産大学

小出 真悟 鹿児島県保健福祉部生活衛生課

小西 良子 麻布大学

坂田 淳子 大阪府立公衆衛生研究所

品川 邦汎 岩手大学

橘 理人 岡山大学

茶園 明 日本食品安全検証機構

盆下 誌保 東京家政大学

中村 寛海 大阪市立環境科学研究所

藤田 雅弘 群馬県衛生環境研究所

榊田 和彌 国立医薬品食品衛生研究所

村上 覚史 東京農業大学

森 篤志 日本冷凍食品検査協会

山本 詩織 国立医薬品食品衛生研究所

渡辺 邦雄 日本食品安全検証機構

渡邊 真弘 日本冷凍食品検査協会

（敬称略、五十音順）

平成28年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
総括研究報告書

食鳥肉におけるカンピロバクター汚染のリスク管理に関する研究

研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨：本研究では、食鳥肉の生産・処理・流通の各段階において、カンピロバクター汚染低減に資する衛生管理手法に関する科学的知見の集積を図り、より衛生的な食鳥肉の生産～消費に至るフードチェーンの在り方に関する提言を行うことで、本食中毒低減に資するガイドライン策定等の厚生労働行政に寄与することを目的として研究を行なった。研究班では、食鳥肉に関わるフードチェーンを、(1)養鶏農場での生産段階、(2)食鳥処理場における解体段階、(3)加工・流通段階、(4)消費段階の4つに区分した上で、各工程における汚染低減手法に関する情報・データ収集を行うこととしている。

本年度は、以下の研究成果を得た。(1)生産段階では国内3養鶏農場より出荷されるブロイラー鶏盲腸便を対象に、カンピロバクター検出試験を行い、本菌陽性・陰性農場の識別を行った上で、構成菌叢を農場別に比較し、*Bacteroides*属菌の構成比率とカンピロバクター保菌との間に関連性があることを前年度に引き続き検証し、これを確認した。その上で、カンピロバクター陰性検体より*Bacteroides*属菌の単離を行い、得られた株がカンピロバクターの生存増殖を抑制する作用を示すことを共培養試験を通じて明らかにした。*Bacteroides*分離株由来抽出物についても同様の静菌作用を示したことを受け、来年度には農場での生体を用いた実証試験を行い、その有効性を評価したい。(2)食鳥処理段階では、外剥ぎ方式の処理を受けた鶏肉の汚染実態が一般的な中抜き方式で処理された鶏肉に比べて低いことを示した。また、九州地方の生食用鶏肉の処理工程を視察し、ブロイラー鶏ではなく、廃鶏が主な対象であること、表面焼烙が実施されている実態を把握した。ニュージーランドの食鳥処理施設を視察すると共に、当該国の規制当局担当者らと意見情報交換を行い、当該国でのカンピロバクター食中毒低減に効果的であった工程・手法として、殺菌剤の断続的シャワーリングおよびチラー槽内の複合的管理体制の充実であることを把握した。(3)加工・流通段階では、鶏肉表面へのカンピロバクター添加試験を通じ、当該菌が鶏肉内部へ浸潤性を示すことを定量的に評価した。また、表面加熱手法の一つである温浴加熱によって全体での汚染菌数は低減するものの、本菌は内部浸潤を示すため、一定数生残することを明らかにした。(4)流通・消費段階では、南九州地方の郷土料理として根付く、鶏刺しが生食用として市販流通している実態を鑑み、同食品におけるカンピロバクター汚染状況を加熱用鶏肉と定量比較し、前者の汚染菌数は相対的に低い実態を把握した。また、一部の生食用鶏肉検体では高度の汚染も見受けられたが、これらは一部の施設に限定的であることを製造者をトレースすることにより明らかにした。

研究分担者

山本 茂貴* (東海大学 海洋学部)
森田 幸雄 (東京家政大学 家政学部)
中馬 猛久 (鹿児島大学 共同獣医学部)

* 平成 28 年 12 月まで

研究協力者

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

(敬称略、五十音順)

A. 研究目的

食鳥肉の喫食に因るカンピロバクター食中毒は例年多発しており、その対策が大きな社会的課題となっている。これに関連する国際情勢としては、コーデックス委員会により2011年にフードチェーンを通じた食鳥肉の衛生対策ガイドラインが発行されている(CAC/GL 78-2011)他、わが国では2009年に食品安全委員会により、鶏肉におけるカンピロバクター汚染に関するリスク評価書が取り纏められている。前回の研究班(と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化とカンピロバクター等の制御に関する研究)においては、特に食鳥肉における本菌汚染状況の改善に向けて、今後検討されるべきとして、食品安全委員会のリスク評価書において提案された検討課題の有効性を、農場・食鳥処理・流通の各段階で検証し、農場における汚染制御は未だに困難であるが、食鳥処理場へ搬入される時点での汚染・非汚染鶏群の識別と区分処理が可能であれば、交叉汚染を制御する上で有効に機能する点、そして流通段階で活用が想定される冷凍処理が一定の汚染低減に資するであろうとの見解を得た。同研究班では、畜産食品に関連する複数の課題が含まれ、その衛生管理という全容の改善を目的としていた。これに対し、本研究班では、これまでに蓄積された研究成果を、食鳥肉におけるカンピロバクターのリスク管理という点に集約させることで、生食或いは加熱不十分な食鳥肉の喫食に基づくカンピロバクター食中毒の制御を命題として、生産から流通工程に至るフードチェーンの中において、実行性を伴った衛生管理の在り方を提言すると共に、その実施により想定される汚染低減効果を予測し、有効性を明らかにしようとするところに特色がある。より具体的には、食鳥肉の生産・解体処理・加工・流通・消費等の各プロセスにおける情勢を把握すると共に、汚染低減に資するハード・ソフト両面での対策の在り方について例示を行う等、応用的汚染低減手法の具体的提案等を網羅し、厚生労働行政として対応が求められる、衛生的な食鳥肉処理に関するガイドラインの策定等に寄与するための科学的知見の集積を

図る。また、生食としての鶏肉の消費実態を鑑み、本研究では、生食用鶏肉として市販流通する製品の汚染実態を把握すると共に、当該製品の解体～加工にあたって実施される衛生管理手法に関する情報収集も含めた検討を行うこととしている。

以下に、各段階に応じた研究目的等を記す。

(1) 農場段階

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

鶏生体における本菌の汚染(定着)への対策としては、これまでも乳酸菌やバシラス属菌等、いわゆる生菌剤(プロバイオティクス)の投与により、一定の抑制効果を果たすことが報告されている。より近年では、こうしたプロバイオティクス効果を裏付ける要因として、乳酸菌の菌体表層タンパク分子あるいは有機酸代謝能といった分子や代謝機構が、カンピロバクターの鶏腸管定着抑制を支える分子基盤として明らかにされつつあるが、それらの多くは依然として不明である。養鶏場での本菌制御策は、世界的な課題として、現在も解決されていないが、一般的に知られる上述のプロバイオティクス細菌以外にも、近年では、カンピロバクターの鶏腸管定着に抑制作用を示す、種々の腸内菌叢が報告されており、生産段階での制御策の構築にあたって期待がもたれる研究分野の一つとなっている。

こうした背景より、本研究では、出荷時齢のブロイラー鶏を対象として、昨年度に検討対象とした7

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

(2) 食鳥処理段階

鶏が農場に導入された時点の初生雛ではカンピロバクターはほとんど検出されないが、飼育週令が増すごとにカンピロバクターを腸管内に保菌するようになり、飼育後2-3週目で菌の排出がはじまり、その後急速に感染が拡大することが知られている。カンピロバクターは腸管内に生息していることから、食肉処理工程で腸管内容物からのと体への汚染や冷却工程によるチラー水の汚染により多くのと体への汚染が考えられる。

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

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

(3) 加工・流通段階

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

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

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

(4) 流通・消費段階

鹿児島県や宮崎県といった南九州地方では、昔から鶏肉を生で食す鶏刺しが郷土料理として、一般に食される。同地方での鶏刺しは小売店や居酒屋で普通に見られ、東京や大阪といった都市圏でも提供を行う居酒屋が多く存在する。鶏刺しは鶏のもも・むね・ささみ等の部位を用い、表面を湯引きや火で炙るなどして加熱してあることが多い。これによって、鶏肉の表面に汚染したカンピロバクターの一部を殺菌し、食中毒のリスクを下げていると考えられる。カンピロバクター感染の主な原因食品として鶏刺しは注目されるが、一般に流通している鶏刺しのカンピロバクター汚染率やその菌数といった基礎的データを調査した報告は殆どなく、今後これらを明らかにすることは食品衛生上重要な課題である。

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

B. 研究方法

1. 農場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 検体

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

2) 分離培養試験(定性)

上記シードスワブより取り出した盲腸便検体は計量後、速やかに1mLの滅菌リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)に懸濁した。うち0.5mLについては、10mLのプレストン培地(ニッセイバイオ)に加え、42にて48時間、微好気培養を行った。その後、同培養液を1白金耳分、mCCDA寒天培地に塗布し、42で48時間微好気培養を行った。培養後、各検体につき、代表的発育集落を5つ釣菌し、継代培養を行った後、生化学性状試験及びPCR法による菌種同定を行うことで、陽性・陰性の判定を行った。

3) DNA抽出

2.で調整した懸濁溶液残液約0.5mLより、Cica Genious Total DNA prep kit(関東化学)を用いて、DNA抽出を行った。また、分離株についても、同様にDNA抽出を行い、MLST解析に供した。

4) 菌叢解析

盲腸便スワブ懸濁液より抽出したDNAを鋳型として、16SrRNA799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR反応を行い、増幅産物を精製した。同精製物は、定量後、30検体を上限として等量から成る混合ライブラリーを作成し、Ion Chef / Ion PGM システムを用いた barcoded pyrosequencing 解析に供した。取得配列データより不要配列を除去した後、RDP Classifier pipeline を介して、リード配列の階級付けを行った。その後、Metagenome@KIN プログラムを用い、階層解析等を行った。

5) *Bacteroides* 属菌の分離

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

6) *C. jejuni*/*B. fragilis* 共培養試験

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

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

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

また、上述の*B. fragilis* an-51株由来菌体破碎抽出物(30 μ g/mL)に対して、Proteinase K

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

2. 食鳥処理段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 外剥方式処理場製品と一般市販製品の比較

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

検査項目は一般生菌、大腸菌群、大腸菌、カンピロバクター、サルモネラとした。

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

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

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

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

2) 鶏肉製品の細菌検査

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

3 .加工・流通段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 鶏肉検体

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

2) 鶏肉内部浸潤性試験

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

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

3) 温浴加熱による汚染低減効果の検証

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

4) 温浴加熱を通じた鶏肉内部でのカンピロバクター生存性に関する検証試験

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

5) 市販鶏刺し製品におけるカンピロバクター定性検出試験

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

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

4. 消費段階におけるカンピロバクターのリスク管 理に関する研究

1) .検体

材料は鹿児島県内小売店 8 店舗にて購入した生
食用鶏肉 6 1 検体、加熱用鶏肉 4 6 検体の計 1 0
7 検体とした。何れの検体についても、購入日のう
ちに、試験に供した。購入鶏肉製品については、購
入・加工年月日、製品名、販売事業者名、加工事
業者名等の情報を製品表示を根拠として記録した。加
工事業者の規模はさまざまであり、計 1 0 事業者由
来の検体を得ることができた。

2) MPN 法 (最確数法)

MPN 3 本法を用いカンピロバクターの汚染菌数
を推定定量した。試験法の概要は図 1 に記す。まず、
鶏肉 50g をプレストン液体培地 50ml の入った袋
にいれ、ストマッカにて十分に混和した。混和後
のプレストン液体培地を 10ml ずつ 3 本の試験管に
分注し、さらに 1 ml、0.1ml をそれぞれ 10ml プ
レストン液体培地入り試験管に接種し、これらを
42℃の微好気条件下にて 48 時間培養した。培養後
は、培養液 1 白金耳を mCCDA 培地上に塗抹し、
再び 42℃の微好気条件下にて 48 時間培養を行っ
た。mCCDA 培地上でカンピロバクター様の定型集
落が認められたものについては、位相差顕微鏡を用
いた菌体形態の観察、ならびに *C. jejuni*, *C. coli*
同定のための PCR を行い、陽性・陰性の判定を行
った。

C . 研究成果

1 .農場におけるカンピロバクターのリスク管理に 関する研究

1) 農場の汚染状況

計 3 農場 (A・B 農場については 4 鶏舎由来、C
農場については 2 鶏舎由来)で採材された出荷時齢
鶏盲腸便計 60 検体について、カンピロバクター分

離を試みた。昨年度と同様、C 農場由来検体 (計
60 検体) は全て陰性であったが、A・B 農場由来
検体は、それぞれ 11 検体 (55%; 有薬群、3 検体
(陽性率 30%); 無薬群、8 検体 (80%))、13 検
体 (65%) が陽性を示した。また、分離株につい
ては、何れも *C. jejuni*であった。

以上の成績より、今回供試した出荷時齢の鶏盲腸
便検体全体の陽性率は、58.3% (陽性検体 35 / 60
検体) となり、陽性・陰性農場 (鶏舎) はそれぞれ
4 および 3 農場であることが明らかとなった。

2) 鶏盲腸便構成菌叢の比較解析

出荷時の鶏盲腸便検体の構成菌叢に関する知見
を得るため、A~C 農場由来検体より、各 3 検体を
無作為に抽出し、16S rRNA pyrosequencing 解析
に供した。カンピロバクター分離陰性となった C
農場由来検体と、同陽性を示した A・B 農場間にて
構成比率に有意差を認める菌属を探索したところ、
Bacteroides 属が両群間で有意差を示し、C 農場由
来検体では、平均 16.7%の構成比率であったのに
対し、A・B 農場由来検体における上記属菌の構成
比率は 4.0 - 5.7%に留まった。以上より、年度に
因らず *Bacteroides* 属がカンピロバクター分離培
養成績と一定の相関性を示すことが改めて実証さ
れた。

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

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

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

4) カンピロバクターの生存増殖に対する *B.*

fragilis 抽出物の制御効果

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

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

2. 食鳥処理場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 外剥方式処理場製品と一般市販製品の比較

i) 一般生菌数

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

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

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

ii) 大腸菌群数

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

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

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

iii) 大腸菌数

iii) 大腸菌数

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

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

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

iv) カンピロバクター

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

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

ササミ：処理場製品からは 2 検体ともに未検出

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

v) サルモネラ

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

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

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

2) 原料は外剥方式の食鳥処理場製の一般市販されている製品の細菌検査結果

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

3. 加工・流通段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) カンピロバクターの鶏肉内部浸潤性

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

2) 温浴加熱を通じた鶏肉中カンピロバクターの汚染低減効果

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

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

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

4) 市販冷凍鶏刺し製品におけるカンピロバクターの検出状況

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

4 . 流通・消費段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

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

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

D. 考察

1. 農場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

本研究では、養鶏農場にて採材した出荷時齢鶏盲腸便を対象として、カンピロバクター保菌状況を検討するとともに、当該菌の保菌状況と *Bacteroides* 属菌等の構成比との関連性を継続調査した。

カンピロバクターが顕す鶏腸管定着は、概ね 3 - 4 週齢以降に生じるとされる。同時期は、いわゆる換羽期に相当するため、免疫機構の大幅な変動が予想される他、菌叢にも多大な影響が生じると目される。本研究では、昨年度に引き続き、鶏盲腸菌叢の中で、カンピロバクター保菌とただし *Bacteroides* 属占有率についての関連性を検討し、対象農場における普遍性を明らかにした。

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

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

2. 食鳥処理場におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

1) 外剥方式の食鳥処理場製品と一般製品の比較

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

一般生菌数

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

大腸菌群数

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

大腸菌数

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

カンピロバクター

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

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

サルモネラ

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

2) 原料は外剥方式の食鳥処理場製の一般市販されている製品の細菌検査結果

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

3. 加工・流通段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

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

4. 流通・消費段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

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

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

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

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

E. 結論

1. 農場におけるカンピロバクターのリスク管理に

関する研究

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

2. 食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

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

3. 加工・流通段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

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

4. 流通・消費段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

生食用鶏肉として販売される鳥刺しのカンピロ

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

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 書籍

1) 朝倉 宏 . 食鳥肉におけるカンピロバクター汚染のリスク管理に関する研究 . 食と健康 . 2016年8月号 . pp.18-24.

2. 論文

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

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

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

3. 学会発表

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

2) 朝倉宏 . ゲノムデータに基づく、カンピロバク

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

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

H. 知的財産権取得状況

該当なし

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

鶏盲腸菌叢が顕すカンピロバクター制御効果に関する研究

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	倉園久生	国立大学法人帯広畜産大学
研究協力者	川本恵子	国立大学法人帯広畜産大学
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	東京農業大学農学部
研究協力者	橋 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	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

（* 平成 28 年 12 月迄）

研究要旨：昨年度検討対象とした農場のうち、計 3 農場（A, B, C）において生産される出荷日齢のブロイラー鶏盲腸便計 60 検体を採材し、カンピロバクター検出試験に供した。C 農場由来検体は全て本菌陰性を示したが、A・B 農場由来検体は、それぞれ 4 検体（20%）および 13 検体（65%）で陽性を示した。農場別に検体構成菌叢を比較したところ、昨年度の成績を裏付けるように、カンピロバクター陰性を示した C 農場由来検体では、相対的に高い *Bacteroides* 属菌構成比率が認められた。当該検体より *Bacteroides* 属菌株を分離同定し（何れも *B. fragilis*）、*C. jejuni* NCTC 11168 株との共培養試験に供したところ、*C. jejuni* は経時的減少が認められた。*B. fragilis* 由来菌体破砕物を *C. jejuni* 株に添加し、同様に微好気培養を行ったところ濃度依存的に *C. jejuni* の増殖を抑制する事象が見いだされた。本菌抽出物による *C. jejuni* に対する抑制効果は、Proteinase 処理により低減したことから、*B. fragilis* 抽出物により生じる静菌作用はタンパク性因子により生じるものと推察された。以上の成績より、*C. jejuni* の生存・増殖が *B. fragilis* 添加により有意に制御される事象が実証された。また、鶏由来 *B. fragilis* 株によるカンピロバクター制御作用は主としてタンパク性因子によるものとの推察知見を得たことから、来年度には、当該菌の生菌のみならず、抽出物も視野に入れつつ、鶏生体を用いて制御効果の検証にあたり、農場段階での対策案としての有効性を評価したい。

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発生頻度が高く、その制御策の構築については社会的に求められている。厚生労働省食中毒

統計によると、2015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318件、患者数は2,089人にのぼっており、同年の食中毒事例総数1202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。食中毒事件の報告は、ごく一部に限られるとする疫学見解を踏まえると、実際に本食中毒事例数は更に多いと想定される。

本食中毒罹患患者のうち、発症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（特に軸索型）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については、農場への導入時にあたる幼雛期には本菌陰性であるが、2-3週齢の間に本菌の定着を生じ、以後少なくとも9週間は定着し続けることが明らかになっている。国内に流通する鶏肉の多くは50日齢程度のブロイラー鶏由来であり、本菌による汚染を一旦受けた農場で飼育された鶏群は高率に本菌を保菌している傾向が高い。

また、本菌による鶏肉汚染は、食鳥処理工程での交叉汚染が主な要因と目されているが、そもそも生産段階における本菌制御が確立すれば、カンピロバクター食中毒の低減をはかるにあたって、より根源的な対策を立てることが可能となるため、農場段

階における本菌制御策の構築は必要不可欠な課題の一つといえる。

鶏生体における本菌の汚染（定着）への対策としては、これまでも乳酸菌やバシルス属菌等、いわゆる生菌剤（プロバイオティックス）の投与により、一定の抑制効果を果たすことが報告されている。より近年では、こうしたプロバイオティックス効果を裏付ける要因として、乳酸菌の菌体表層タンパク分子あるいは有機酸代謝能といった分子や代謝機構が、カンピロバクターの鶏腸管定着抑制を支える分子基盤として明らかにされつつあるが、それらの多くは依然として不明である。養鶏場での本菌制御策は、世界的な課題として、現在も解決されていないが、一般的に知られる上述のプロバイオティックス細菌以外にも、近年では、カンピロバクターの鶏腸管定着に抑制作用を示す、種々の腸内菌叢が報告されており、生産段階での制御策の構築にあたって期待がもたれる研究分野の一つとなっている。

こうした背景より、本研究では、出荷時齢のプロイラー鶏を対象として、昨年度に検討対象とした7養鶏農場のうち、本菌陽性または陰性であることが確認された計3農場を対象に、本年度も出荷時齢鶏盲腸便のカンピロバクター検出状況及び構成菌叢を継続的に検証した。その中で出荷時にカンピロバクター陰性であることが示された1農場由来検体よりカンピロバクター保菌との関連性が示唆された *Bacteroides* 属菌の分離を行い、試験管内における *C. jejuni* 生存増殖への影響について検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 供試検体の採材

平成28年10月～12月の間に、九州地方にあるA/B農場および北海道・東北地方のC農場において飼養され、出荷時齢にある肉用鶏盲腸便（A及びB農場については20検体、C農場については10検体）をシードスワブ（ニッスイ）を用いて採材した。採材検体は速やかに冷蔵温度帯で研究室に輸送し、カンピロバクター定性検出試験に供した。また、A及びB農場については、当該鶏舎より出荷され、解体処理を受けたモモ肉についても各5検体ずつ採材し、カンピロバクター定量検出試験に供した。

また、上記とは異なる農場DおよびE農場で飼養された肉用鶏盲腸便について、1週齢から出荷時齢まで概ね1週間ごとに採材し、冷凍にて菌叢解析用検体として使用時まで保存した。

2. 分離培養試験（定性）

上記シードスワブより取り出した盲腸便検体は計量後、速やかに1mLの滅菌リン酸緩衝液（PBS, pH7.4）（Thermo Fisher）に懸濁した。うち0.5mLについては、10mLのプレストン培地（ニッセイバイオ）に加え、42℃にて48時間、微好気培養を行った。その後、同培養液を1白金耳分、mCCDA寒天培地に塗布し、42℃で48時間微好気培養を行った。培養後、各検体につき、代表的発育集落を5つ釣菌し、継代培養を行った後、生化学性状試験及びPCR法による菌種同定を行うことで、陽性・陰性の判定を行った。

3. DNA抽出

2.で調整した懸濁溶液残液約0.5mLより、Cica Genious Total DNA prep kit（関東化学）を用いて、DNA抽出を行った。また、分離株についても、同様にDNA抽出を行い、MLST解析に供した。

4. 菌叢解析

盲腸便スワブ懸濁溶液より抽出した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（ワールドヒュージョン）を用い、クラスター解析を行った。

5. *Bacteroides* 属菌の分離

C農場由来盲腸便検体より、Duerdenの方法（J Med Microbiol. 13: 69-78. 1980.）に従って*Bacteroides*属菌の分離を行った。得られた分離株については、16S rRNA部分配列解析データをもとに、NCBI Blastn検索を通じて菌種同定を行い、-80℃にて保存した。

6. *B. fragilis* ゲノム解析

B. fragilis an-51株より全ゲノムを抽出

し、常法に従い、PacBio RSII を用いてドラフトゲノム配列を取得した。得られた配列については、不要配列を除去後、CLC Genomic Workbench ver. 9.0 (Qiagen-CLC)を用いてContig配列を取得すると共に、RAST pipelineを用いて、アノテーション情報を取得した。

7. *C. jejuni*/*B. fragilis* 共培養試験

約 10^4 CFU の *C. jejuni* NCTC 11168 株を 10mL の Mueller-Hinton broth または BHIS broth に懸濁した後、同菌数の *B. fragilis* an-3 株, an-51 株, JCM11019 株をそれぞれ添加し、微好気または嫌気条件下にて培養した。24 時間毎に各培養液を採取し、Mueller-Hinton 寒天培地および BHIS 寒天培地に接種後、それぞれ微好気または嫌気条件下にて培養し、発育集落数を求めた。

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

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

また、上述の *B. fragilis* an-51 株由来菌体破碎抽出物 (30 μ g/mL) に対して、Proteinase K (Promega) 100 μ g/mL あるいは Bensonase 25 unit/mL (タカラバ

イオ)を用いて前処理した後、約 10^4 CFU の *C. jejuni* NCTC 11168 株を 10mL の Mueller-Hinton broth または BHIS broth に懸濁し、当該菌の生存増殖性について、同様に、濁度計を用いて測定した。

C. 結果

1. 陽性・陰性農場の識別

計 3 農場 (A・B・C) 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を表 1 に示す。昨年度と同様、C 農場由来検体 (計 20 検体) は全て陰性であったが、A・B 農場由来検体は、それぞれ 4 検体 (20%)、13 検体 (65%) が陽性を示した。また、分離株については、何れも *C. jejuni* が主体であった (表 1)。

以上の成績より、今回供試した出荷時齢の鶏盲腸便検体全体の陽性率は、58.3% (陽性検体 35 / 60 検体) となり、陽性・陰性農場 (鶏舎) はそれぞれ 4 および 3 農場であることが明らかとなった。

2. 鶏盲腸便構成菌叢の比較解析

出荷時の鶏盲腸便検体の構成菌叢に関する知見を得るため、A~C 農場由来検体より、各 3 検体を無作為に抽出し、16S rRNA pyrosequencing 解析に供した。成績概要については図 1 に示した。カンピロバクター分離陰性となった C 農場由来検体と、同陽性を示した A・B 農場由来検体の間で構成比率に有意差を認める菌属を探索したところ、昨年度の成績と同様に、*Bacteroides* 属がカンピロバクター陽性・陰性農場間で有意差を示し、C 農場由来検体における占

有率が平均 19.8%であったのに対し、A・B 農場由来検体における上記属菌の占有率はそれぞれ 8.2%および 5.5%に留まった。

また、別農場由来ではあるが、鶏盲腸便中での *Bacteroidales* 占有率について、生体の週齢をおって経時的に観察したところ、仕上げ飼料を給餌される出荷前 1 週間で顕著な増加を示すことが明らかとなった（図 1）。

以上の成績より、年度に因らず *Bacteroides* 属がカンピロバクター分離培養成績と一定の相関性を示すことが改めて実証された。

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

カンピロバクター陰性を示した C 農場由来鶏盲腸便検体より、*B. fragilis* an-3 株および an-51 株を分離した（表 2）。当該株ならびに標準株である JCM11019 株を hemin および Vitamin K を含む BHI プロス中にて嫌気培養した後、並行して培養した *C. jejuni* NCTC 11168 株をそれぞれ約 10^4 CFU となるよう、MH プロスあるいは BHI プロス中に懸濁し、微好気および嫌気条件下にて生菌数の挙動を経過観察した。

結果として、菌株及び大気条件に因らず、*B. fragilis* は何れも試験管内における *C. jejuni* の生存・増殖を経時的に減少させた（図 3）。

4. カンピロバクターの生存増殖に対する *B. fragilis* 抽出物の制御効果

異なるタンパク濃度の *B. fragilis* 菌体破碎抽出物を約 10^4 CFU の *C. jejuni* NCTC11168 株を含む液体培地中に添加し、後者の生存増殖性を経時的に観察したとこ

ろ、濃度依存的に本抽出物は *C. jejuni* の増殖を低減させることが明らかとなった（図 4）。本抽出物を Proteinase K を用いて前処理を行った場合、*C. jejuni* の生存増殖に対する制御効果は、無処理投与群に比べ、大きく低減した（図 5）。

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

D. 考察

カンピロバクターが顕す鶏腸管定着は、概ね 3 - 4 週齢以降に生じるとされる。同時期は、いわゆる換羽期に相当するため、免疫機構の大幅な変動が予想される他、菌叢にも多大な影響が生じると目される。本研究では、昨年度に引き続き、鶏盲腸菌叢の中で、カンピロバクター保菌の有無と、*Bacteroides* 属占有率について対象農場における普遍性を明らかにすることができた。また、鶏盲腸における *Bacteroidales* 占有率の経時変動成績から、当該属菌は少なくとも換羽期以降に鶏盲腸内に侵入し、潜在的に存在し続けることがカンピロバクター定着に抑制的に作用するものと想定された。

こうした状況を踏まえ、本年度は *Bacteroides* 属分離株が顕す、カンピロバクターの生存増殖に対する影響を試験管内において検討し、実際にその効果を見出すことができた。実際に農場での実証試験等を行う上で、*Bacteroides* 属菌投与の方法としては、飼料への添加等が想定されるが *Bacteroides* 属菌体抽出物がカンピロバクター生存増殖に対する制御効果を示したことから考えて、その投与対象としては必ず

しも生菌である必要性は少ないとも目される。来年度に向けては、本属菌の生菌あるいは抽出物投与による、鶏生体でのカンピロバクター保菌への制御効果を検討することで、農場での制御手法としての有効性を明らかにしたい。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

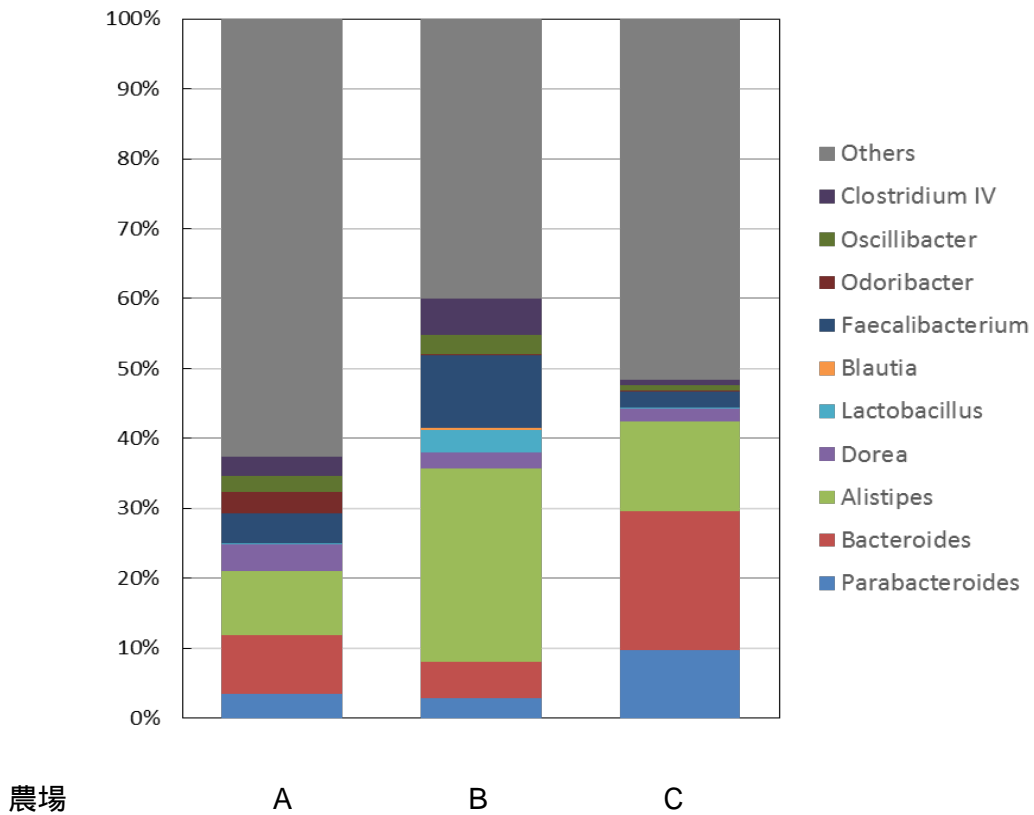


図 1 . 3 農場由来出荷時齢鶏盲腸構成細菌叢の比較概要

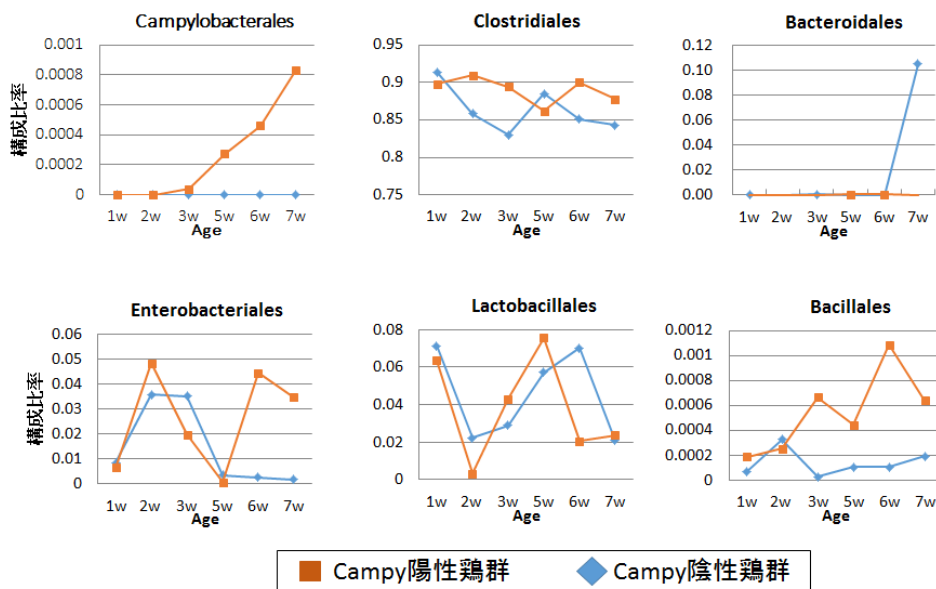


図 2 . 農場 A・C 由来鶏盲腸便検体における主要菌叢の経時挙動 .

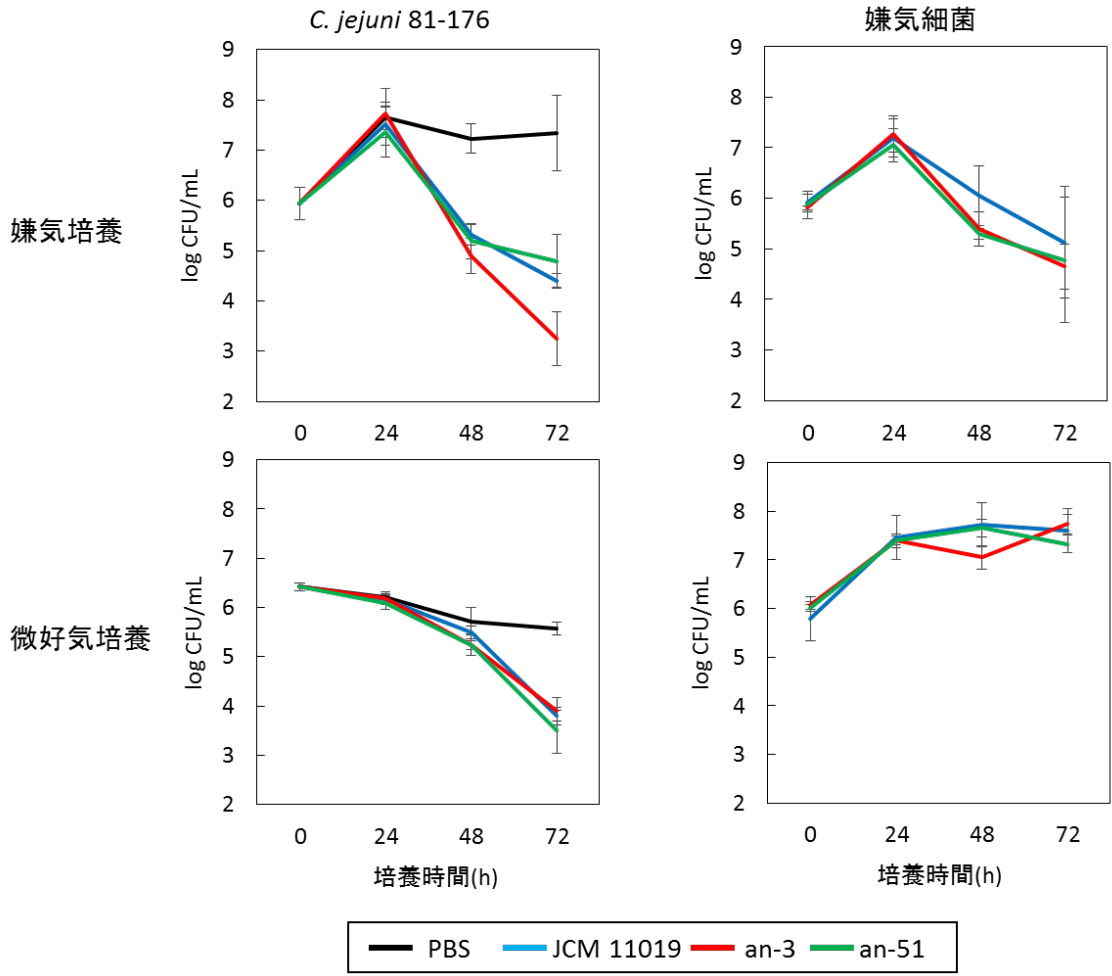
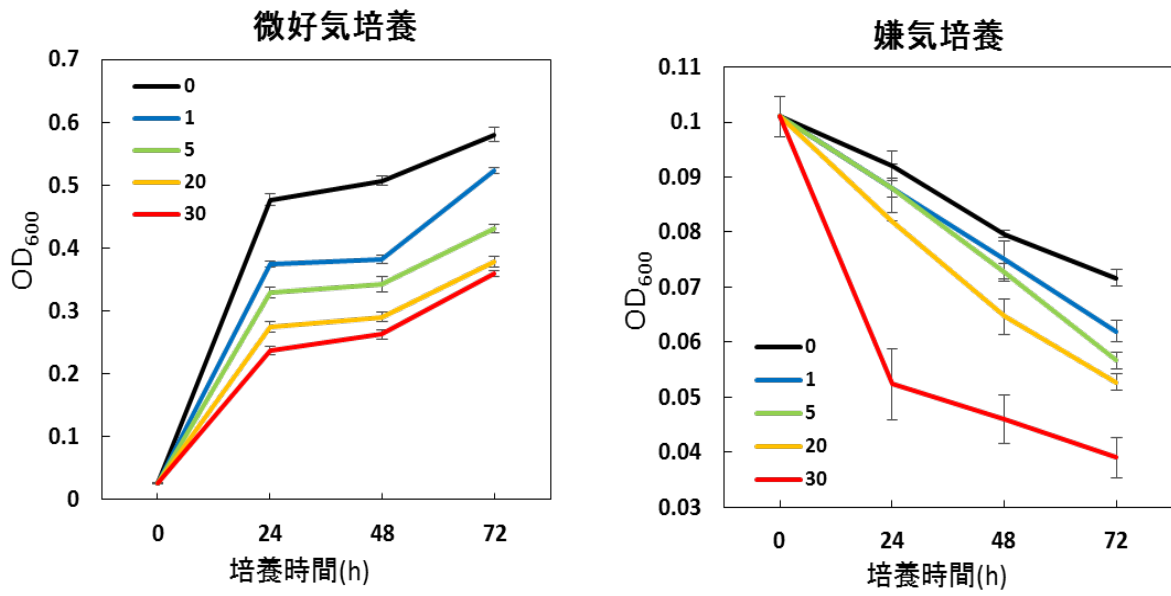


図3 . *B. fragilis* との共培養による *C. jejuni* NCTC 11168 株の生存増殖への影響

A



B

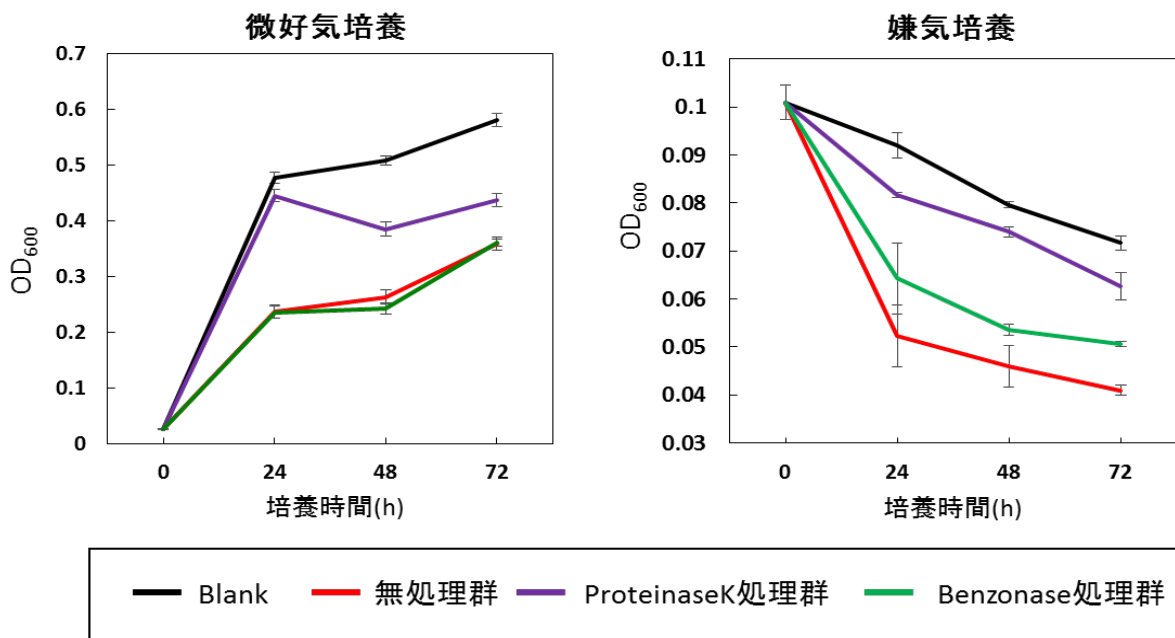


図4 . *B. fragilis* an-51 破碎抽出物の *C. jejuni* NCTC 11168 生存増殖性に対する影響 .

表 1. 農場 A-C において採材した出荷時齢鶏盲腸便からの分離培養成績

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	48-49 日齢	20	4 (20%)	<i>C. jejuni</i> (3) <i>C. coli</i> (1)
B 農場	有薬	47 日齢	20	13 (65%)	<i>C. jejuni</i> (10) <i>C. coli</i> (3)
C 農場	有薬	51 日齢	20	0 (0%)	-

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
分担研究項目：食鳥処理方式による鶏肉の汚染状況について

研究協力者 盆下誌保
分担研究者 森田幸雄

東京家政大学
東京家政大学

研究要旨

カンピロバクターは鶏肉から頻繁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、外剥方式の処理場で生産されている製品とスーパーマーケット等で一般市販されている製品とを比較した。一般生菌数ではムネとササミが少ない傾向があった。また、外剥方式のモモでも、市販のモモでも約 7 割という高率のカンピロバクターが検出されていた。しかし、カンピロバクター数では外剥方式のモモの方が、市販のモモよりも少ない傾向があった。外剥方式の処理場でもカンピロバクター汚染は市販製品と同様であることが判明した。

A. 研究目的

2015年の我が国の食中毒発生件数は1,202件、食中毒患者数は22,718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位はノロウイルス（481件、15,876人）、第2位はカンピロバクター（318件、2,089人）であり、細菌性食中毒ではカンピロバクターによる食中毒は食品衛生上重要である。

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。カンピロバクターは腸管内に生息していることから、食肉処理工程で腸管内容物からのと体への汚染や冷却工程によるチラー水の汚染により多くのと体への汚染が考えられる。

我が国の食鳥処理場では内臓をと体から抜

きとり、内臓検査とと体検査を同時に実施する中抜方式が主流であり、外剥方式は極めて少数である。外剥方式は内臓を傷つけなくて、最初鶏肉をはぎ取ることから衛生的な処理と推定される。

以上のことから、今年は外剥方式の食鳥処理場製品およびスーパーマーケット等で市販されている製品について細菌学的な比較を実施した。なお、昨年実施したエアーチラーを設置している食鳥処理場への実態調査は鳥インフルエンザの流行等で立ち入りが制限され実施できなかった。

B. 研究方法

1. 外剥方式の食鳥処理場製品と一般市販されている製品の比較

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

ケット 10 店舗からムネ、モモ、ササミを 10 検体ずつ購入した。

検査項目は一般生菌、大腸菌群、大腸菌、カンピロバクター、サルモネラとした。

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

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

サルモネラ数：検体 25g を 225mL の Nutrient broth No.2 (Oxoid) の入った滅菌ストマック袋に加え、ストマッカー処理を 1 分間実施した。その希釈 10mL, 1mL, 100 μ L をそれぞれ 100mL の RV 培地 (Oxoid) に 3 本ずつ接種し、 42 で 24 時間、好気培養を実施した。その後、培養液 1 白金耳量を DHL 寒天培地（日水）とブリリアンスサルモネラ（サーモフィッシャー）に接種し、 37 で 12 時間、好気培養した。

発育集落のうち、典型集落を 3 つ釣菌し、サルモネラの確認試験に供し、最確数法換算表を参照し、各検体の菌数を求めた。なお、サルモネラであることが確認できた集落が 1 つ以上あった場合、その検体は陽性とした。

2. 原料は外剥方式の食鳥処理場製の一般市販されている製品の細菌検査

外剥方式の食鳥処理場製であるがスーパーマーケットで小分け市販されている製品（モモ）を 10 検体購入し、カンピロバクター検査を実施した。検査法は前述のカンピロバクターの検出方法で実施した。

C. 研究結果

1. 外剥方式の食鳥処理場製品と一般市販されている製品の比較（表 1）

1) 一般生菌数

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

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

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

2) 大腸菌群数

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

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

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

3) 大腸菌数

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

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

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

4) カンピロバクター

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

モモ：処理場製品からは 2 検体中 2 検体検出され、100g あたりの平均の対数値 ± 標準偏差は 2.50 ± 0.19 であった。モモの市販製品か

らは 10 検体中 7 検体検出され、100g あたりの平均の対数値 ± 標準偏差は 3.40 ± 0.52 であった。t 検定の結果、危険率 3% 未満で有意差があった。

ササミ：処理場製品からは 2 検体ともに未検出であった。ササミの市販製品からは 10 検体中 5 検体検出され、100g あたりの平均の対数値 ± 標準偏差は 2.02 ± 0.39 であった。

5) サルモネラ

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

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

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

2. 原料は外剥方式の食鳥処理場製の一般市販されている製品の細菌検査結果

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

D. 考察

1. 外剥方式の食鳥処理場製品と一般市販されている製品の比較

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

1) 一般生菌数

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

2) 大腸菌群数

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

3) 大腸菌数

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

4) カンピロバクター

市販製品からは高率(ムネ:5/10検体、モモ:7/10検体、ササミ:5/10、計17/30検体)に分離されている。処理場製品からも高率(モモ:2/2、計2/6検体)から分離されている。製品へのカンピロバクター汚染は保菌鶏農場のロットの処理の有無によって左右されるが、処理場製品、市販製品ともに高率にカンピロバクターが分離されているが、菌数は処理場の製品のほうが、市販製品よりも少ないかもしれない。

5) サルモネラ

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

は少ないかもしれない。

2. 原料は外剥方式の食鳥処理場製の一般市販されている製品の細菌検査結果

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表等

藤田雅弘, 遠藤健太郎, 塩野雅孝, 森田幸

雄, 朝倉 宏, 山本茂貴, 食鳥処理場におけるカンピロバクター交差汚染状況, 日本食品微生物学雑誌, 33(4), 182-186(2016)

2. 学会等発表

森田幸雄, 全国食肉衛生検査所協議会 特別講演「食鳥肉の衛生管理」, 星陵会館, 平成29年1月26日

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

表 1. 外剥方式処理場生産肉と一般市販肉の各菌の検出状況

検体名・条件	調査 検体数	一般生菌数		大腸菌群数		大腸菌数		カンピロバクター		サルモネラ	
		陽性 検体数	平均菌数*	陽性 検体数	平均菌数*	陽性 検体数	平均菌数*	陽性 検体数	平均菌数**	陽性 検体数	平均菌数**
ムネ・処理場	2	2	4.19±0.15	2	3.83±0.22	1	2.3	0	-	0	-
ムネ・市販	10	10	4.73±0.49	10	3.24±0.69	5	2.56±0.75	5	2.78±1.16	4	1.89±0.66
モモ・処理場	2	2	4.37±0.25	2	4.00±0.54	1	2.77	2	2.50±0.19	0	-
モモ・市販	10	10	4.83±0.52	10	3.35±0.85	4	3.03±0.76	7	3.40±0.52	2	1.71±0.22
ササミ・処理場	2	2	3.01±0.09	0	-	0	-	0	-	0	-
ササミ・市販	10	10	4.97±0.88	10	4.08±1.24	5	2.43±0.56	5	2.02±0.39	0	-

*: 陽性検体の対数値の平均値±標準偏差/g

** : MPN法の陽性検体の対数値の平均値±標準偏差/100g

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

海外の食鳥処理施設における衛生管理に関する情報収集

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	窪田邦宏	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
研究協力者	熊谷優子	国立感染症研究所国際協力室
研究協力者	五十君静信	東京農業大学応用生物科学部

研究要旨：本研究では、カンピロバクター食中毒発生数を 2007 年から 2010 年にかけて大幅に減少させているニュージーランド（以下、NZ）の食鳥処理施設におけるカンピロバクター対策に関する情報収集を目的として、当該国最大手の食鳥処理施設 A を訪問し、施設工程管理に関する情報・意見交換を行った。また、当該国のリスク管理機関である MPI 担当者らとの意見交換を通じ、当該国では食鳥処理工程における衛生管理の充実が本食中毒低減に最も有効な対策の一つであったこと、現在もその改善に向けた検討を進めていることが挙げられた。また、当該国で流通する鶏正肉は冷凍状態での出荷が義務付けられているとの情報を得た。加えて、GBS 発症に対する本食中毒の寄与率、食中毒監視・検査体制等に関する情報を収集することができた。これらの知見を国内の食鳥処理段階等へ応用することは、我が国の鶏肉におけるカンピロバクター汚染低減に資するものと期待される。

A. 研究目的

カンピロバクター食中毒は、我が国をはじめとする先進諸国において明らかな低減を示すことなく蔓延しており、低減対策の確立が広く求められている。欧米諸国の中で、ニュージーランド（以下、NZ）は、5 年以

内に年間のカンピロバクター感染症事例を 50%縮減するという目標を 2003 年に掲げ、実際に同目標の達成を果たしている数少ない国である。2003 年のカンピロバクター感染症は 10 万人あたり 396 であり、先進国の中で最も高い数値であった。このレベルは 2006 年まで継続したが、2008 年には

10万人あたり157に減少し、以降同程度で推移し、2012年は10万人あたり159となっている

(<https://www.nzma.org.nz/journal/read-the-journal/all-issues/2010-2019/2014/vol-127-no.-1391/editorial-lane>)

こうした疫学的背景を踏まえ、本研究では、当該国にて低減目標達成に直接関与した政府リスク管理当局担当者や国立研究機関の研究者、更には当該国最大手の食鳥処理事業者らと意見・情報交換を行うと共に、食鳥処理施設の視察を通じて、管理体制に関する情報を収集したので、報告する。

B. 研究方法

1. 意見・情報交換

NZ最大手の食鳥処理事業者本社(オークランド市)において、NZ政府MPI(Ministry of Primary Industries)担当者、研究機関であるESR(The Institute of Environmental Science and Research)の研究責任者、食鳥処理事業者らと意見情報交換を行った。

2. 食鳥処理施設の視察等

上記の食鳥処理事業者の施設のうち、オークランド市およびクライストチャーチ市にある2施設を訪問し、生鳥受け入れから加工までの工程と管理実態等について視察を行った。

C. 結果

1. 意見情報交換から得られた知見

意見・情報交換を通じて、得られた内容を質疑応答形式で以下に取り纏めた。

1) NZは鶏肉中のカンピロバクターの制圧を目指し、食鳥肉関連業者による更なるCOP(the Code of Practice)の進展、鶏肉中のカンピロバクターを対象とした施策のレビュー、初期及び二次的な家きん類肉の加工業者の監視、フードチェーンの様々な時点における食品のモニタリングを行っているとされる(<http://www.foodsafety.govt.nz/industry/general/foodborne-illness/campylobacter/strategy.htm>)。こうした対策の中で最も普遍性・応用性に富むものとしては何が挙げられるか。

【回答】

食鳥処理施設におけるチラー槽内容(溶媒)とその管理体制の充実を図ることが、NZでの対策において最も有効であったと考える。また、農場では密飼いのブロイラーに比べ、Free-rangeの肉用鶏が近年増加傾向にあり、一定の低減効果に寄与しているかもしれない。単独の対策で低減効果を得ることは難しく、関係者間の連携を通じた複合的対策の成果と考えている。現在は、特に下記項目を重要な課題と捉え、フードチェーンを通じた本食中毒の制御にむけた体制作りとその実施をはかっている。

- ・規制当局による定期的な査察・審査
- ・規制当局・産業界間の連携体制の維持
- ・義務的試験項目・規格基準の設定

この他、Code of Practiceを作成しているので、詳細は以下を参照されたい

(<http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/processing-code-practice-poultry/index.htm>)

2) カンピロバクター食中毒の原因食品として、鶏肉が占める割合はどの程度か？また、他の食品については感染要因としてどのように位置づけ、対策を行っているか？更に、鶏肉による食中毒事例について、主たる感染要因はどこにあると想定しているか？

【回答】

本食中毒の原因食品等の詳細については、下記ウェブサイトを参照されたい (<http://www.foodsafety.govt.nz/science-risk/human-health-surveillance/attribution-of-sources.htm>)。鶏肉からヒトへの感染経路としては、加熱不十分な鶏肉料理や調理時の交叉汚染等が主要なものと推定されているが、これを数値として指し示すには至っていない。また、鶏肉が原因食品に占める割合は、推定手法によって数値変動が大きく、Dutch model では 52%、Island model では 75% となっている。他の食品として、近年 NZ では未殺菌乳の消費量がかなり増加しており、当該食品を介したカンピロバクター食中毒も発生数が増加傾向にあるので、対策を検討している。また、2016 年 8 月には水を原因とする大規模な食中毒も発生しており、上水の消毒工程管理は環境衛生分野での重要な課題と位置づけている。

3) MPI. RISK PROFILE :
CAMPYLOBACTER JEJUNI/COLI IN
POULTRY (WHOLE AND PIECES).

August 2013 の報告によると、NZ で 2003 ~ 2004 年に市販された未調理鶏肉におけるカンピロバクター陽性率は約 81% であったが、2009 年には約 67% に減少したと報告されている。カンピロバクターの鶏肉内汚染率の低減に、鶏の飼育環境改善が寄与したのか。特に下記項目について教えて頂きたい。

- ・害虫、害獣の侵入を防止できる鶏舎構造
- ・飼養管理者への啓発
- ・飼料の内容及び給餌方法
- ・温度管理システム (夏の暑熱低減策等)
- ・トレーサビリティ
- ・配管の洗浄と飲水の消毒について

【回答】

農場での飼養管理については、水や Fly screen 等も含めて議論・検討してきたが、最終的には、バイオセキュリティの観点から鶏舎と飼料をはじめとする衛生管理の徹底をはかること、GHP を実践すること、更には関連業界との連携・情報共有を維持すべきとの結論に至っている。養鶏用の飲水は一般的に殺菌処理をしていない地下水が用いられている。

4) 日本の食品安全委員会が 2009 年に公表したカンピロバクターのリスク評価書では、用量 (菌量) 反応に関する知見は下記の 2 点のみで、更なる知見の収集が望まれている。

- Black RE *et al.* Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. J. Infect. Dis. 1988. 157(3): 472-479
- Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. Brit

Med J. 1981. 282: 1584.

上述の2013年にMPIが作成したリスクプロファイルでは、FAO/WHOの用量反応モデルを引用している。その中では、の攻撃試験の結果(500-800CFU)と共に、Tribbleらが2009年に行った攻撃試験の結果である、“ 1×10^6 CFU 接種群では100%発症し、 1×10^5 CFU 接種群では93%が発症した”という報告を引用している。NZでは本食中毒の最少発症菌数を現在どのように捉えているか。

【回答】

ESR(The Institute of Environmental Science and Research)では、生乳に起因して発生したカンピロバクター食中毒事例のリスクプロファイルを公表しているが、その中で用量反応に関しても概要を述べている (<http://www.mpi.govt.nz/document-vault/1120>)。但し、本菌はBlackらが述べた菌数以下でも環境条件が整えば増殖し、ヒトを発症させる可能性があるとの考えに基づき、最少発症菌数を前提としたリスク管理策の構築を目指していない。FAO/WHOの助言は、あくまでも典型例を挙げているに過ぎないと考えている。

5) MPI Technical Paper No: 2015/32, 2015によると、部位別汚染状況では、最も低い汚染率は手羽先、高い汚染率は手羽元、皮、骨なし胸肉、もも肉であった。一方、首皮の汚染度が高いという報告がEUから出されている。EFSAでは理論上、生鮮肉として販売される製品すべてのバッチ検査において、首皮、胸の皮部分の汚染濃度が1000又は500 CFU/gという微生物学的基準を遵守することができれば、EU

レベルにおいて、>50%又は>90%の公衆衛生上のリスクを減少させることができるとしている (Baré J *et al.* Variation in *Campylobacter* distribution on different sites of broiler carcasses. Food Control 32 (2013) 279: e282)。これらの違いをどのように捉えるべきか、考えを伺いたい。

【回答】

首皮の汚染については、首皮のどの部分をどの程度、採材するかによって大きく異なり、上記の異なる知見はこうしたサンプリングの違いに因るものと解釈する。NZでは一般的に部分肉を用いた検討は行っておらず、丸鳥を対象とした汚染危害評価を行っている。当該手法の検出感度は概して高いとは言い難いが、試験方法も施設間で統一しやすい等の利点もあり、継続的な数値を蓄積し、時系列や場所による比較を行なう上で有用と考えている。将来的には、より感度の高い試験法の導入も考える必要があり、菌株の型別法についても現在研究段階で検討されている。

6) NZの食鳥処理場ではと鳥を複数回リンスするといった対策が行われているという報告もあるが、当該手法を導入するにあたっての問題点や、低減効果を検証するための方策等について教えていただきたい。また、検討したが効果が限定的であった等、問題があったため導入しなかった他の手法があれば併せて教えていただきたい。

【回答】

チラー段階では、様々な薬剤や濃度等の条件に関する情報収集と検証等を進め、より望ましい条件を見出すための官民が協調

して現在も検討し続けている。また、大手3社では、何れも同様の設備を設置しており、チラー槽の改善をはじめ、脱羽・中抜き工程等への最新機器の導入等を進めてきている。これらの Approval は、Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)により実施される。現時点でチラー槽へ添加する殺菌剤としては、次亜塩素酸 Na と酸性電解水を併用している例が多く、視察施設も同様である。また、チラー槽が計4~5槽に分かれており、段階的に上記殺菌剤の濃度、ならびにpHと温度を槽別に制御することで、リンスの効果を高めることができた。また、ラインの複数個所に次亜塩素酸 Na を含むシャワー水をと鳥にあて、洗い流すような構造を導入している。食鳥処理場でのカンピロバクター検査にあたって、視察先である施設 A では、1ロットにつき3羽の丸と鳥を試験に供するプログラムを策定・運用しており(丸鳥1羽に400mLのプレストン培地を加え、1分間揉み出しを行うまでは施設作業現場にて行い、その後同施設内の試験検査室へ洗い液の入った容器を搬送し、速やかに培養試験(定性)に供していた)事業者によって稼働毎に恒常的に検査成績を出し、MPI等への情報提供を受けている。現在、施設 A では、チラーに用いる殺菌剤として他の候補がより効果的であるとの試験成績を社内データとして集積しており、来年度からの導入を計画している。

7) NZでのカンピロバクター対策として実施されている検査手法(サンプリングプラン等も含む)検査体制を教えてください。

【回答】

農場での継続的な調査は国としては行っていないが、一部の生産者は自主的な調査を行い、食鳥処理事業者やMPI等に情報提供している。食鳥処理場での検査実施状況は、6)に記載したとおりである。試験法等は National Microbiological Database (NMD) (<http://www.foodsafety.govt.nz/industry/general/nmd/>)に収録・公開している。これらの試験成績は年毎に、各処理施設事業者よりMPIに情報提供されている。

8) 食鳥処理施設における殺菌剤の使用の有無、出荷後の流通形態(冷凍・冷蔵の別、消費までの日数等)に関して教えていただきたい。

【回答】

殺菌剤として、施設 A では次亜塩素酸 Na と酸性電解水を用いている。丸鳥や部分肉等については急速冷凍処理を行った後、冷凍状態で出荷しており、賞味期限等の設定は、事業者により設定されるものであるが、施設 A の丸鳥製品は、「-20 以下で3ヶ月以内、かつ再凍結を推奨しない」等の表示が製品に記載されていた。なお、加工鶏肉食品(チキンナゲットや味付鳥串等)については、要望に応じて冷蔵(4 以下)で出荷する場合もある。その場合の賞味期限は概ね3日で、近隣の大規模飲食施設や販売店に限定している。同社で生産される鶏肉食品については、国内のほか、オーストラリア、シンガポール、香港等へも輸出されている。

9) MPI の 2013 年のリスクプロファイル

において、カンピロバクター感染症の結果として GBS を発症した割合について、McCarthy 及び Giesecke の 2001 年の報告及び Tam らの 2006 年の報告を引用し、0.02-0.03%と推定されたとの記載がある。ニュージーランドにおける、カンピロバクター感染症を起因とする GBS の発症頻度は 2016 年現在でも同程度なのか。また、その中で鶏肉の喫食を起因とする GBS は、どのくらいの割合で発生しているか、教えて頂きたい。

【回答】

生乳に起因して発生したカンピロバクター事例のリスクプロファイル (<http://www.mpi.govt.nz/document-vault/1120>) では、GBS 症例の約 31% がカンピロバクター先行感染に因るものと位置づけている (Poropatich et al., 2010)。また、GBS による死者数は 1873 例中 56 例 (約 3%) であったと報告されている (<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/2/pdfs/11-1126.pdf>)。鶏肉喫食と GBS 発症との関連性については不明な点も多い。現時点では、GBS 発症患者に関する情報は入院患者に限って入手可能なデータであるが、菌株の遺伝特性解析をはじめとする疫学知見の集積が有効な手段となりうると思っている。

10) ニュージーランドの食中毒に関する疫学調査方法 (実施方法・それらを行う組織、統計方法) について、教えて頂きたい。

【回答】

感染症発生に際しての対応 (報告の取り纏め等) は、MOH (Ministry of Health) / 公衆衛生ユニットが、食品媒介性疾患に関

しては、MPI が主に担当している。この他、Food Standards Australia-New Zealand (FSANZ) では、食品の規格基準の設定等を担当している。ESR は科学的根拠となるデータの解析等を行い MPI へ還元している (http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Transmission_Routes-Science_Research.pdf)。なお、食品の輸出入に係る衛生管理等を担当してきた NZSFA (New Zealand Food Safety Authority) は、2012 年 4 月より MPI に集約されている。食中毒発生状況については <http://www.foodsafety.govt.nz/science-risk/human-health-surveillance/foodborne-disease-annual-reports.htm> を参照されたい。

11) カンピロバクター対策に関連して、アウトブレイク発生時には農政部・衛生部間でどのように連携体制をとっているか。衛生部の調査結果を農政部へフィードバックする等の取り組みがあれば教えて頂きたい。

【回答】

NZ には、8 つの標準的な処理能力を持つ食鳥処理場と、5 つの小規模処理場がある。施設 A 社は国内シェアの約 55% を占め、他の大手 2 社とあわせて国内の 95% 以上のシェアを持つ。農場との連携について、定期的な連絡会議等はあまりないが、情報交換を行う等の連携体制は事業団体間での取り組みとして行っている。また、衛生・農政部局と各事業者を含めた連携は定期的というよりも、必要に応じて (例えば集団食中毒事例が発生した際) その都度連絡会議を開き、協議した上で対応を決定している。それぞれの情報は行政部局間で共有し

ており、その内容は基本的に公開している。
なお、行政上、農政部と衛生部は過去には別省庁として存在したが、現在は再編成され、食品安全部門については MPI にほぼ集約されている。

12) 農場 食鳥処理場間の契約方法はどのようなものか。

【回答】

農場と食鳥処理場との経営は異なる場合がほとんどであるが、それぞれに所属する組織があり、各事業者から出される要望や意見等を集約して、互いに情報を共有できるような体制にはある。食鳥処理場から農場への契約という形は存在する。

13) 疫学成績として、人口10万人当たりの罹患率を出すに際して用いた解析手法(用いた要素等)を教えてください。

【回答】

関連内容は ESR により解析され、MPI より報告されている。米国で報告された手法 (http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/1/P1-1101_article) に倣い、入院患者のうち、カンピロバクター感染が確認された患者の割合等について集計し、罹患率等を推定している。

14) ヒト臨床分離株として、2005-2011 年には、ST-474 型が多い傾向にあると報告されているが、現況はどうか。また、当該遺伝子型株の流行要因に関する推察等があれば教えてください。加えて、菌株の遺伝子型別試験の適用範囲をどのように設定しているか。

【回答】

MASSAY 大学と ESR による解析を通じ、ST-474 型株は養鶏農場との疫学的関連性が高いとの結論に至っている。この遺伝子型株が現在も NZ 国内の農場に蔓延している状況にはないが、鶏との関連性の高い遺伝子型株は依然として高い比率で検出されている。こうした分子疫学情報は、原因食品としての鶏肉の位置付けを考える上での重要な知見と認識し、今後も継続的にデータ収集を行う必要があると考える。MLST については、MPI が担当しており、主たる目的は個々の食中毒事例における疫学的関連性の一次的な解析、原因推定ツールとしての活用、経時的傾向観察のための情報蓄積等である。一方、MPI は ESR と共に、近い将来、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列解析を食中毒対応のための疫学解析手法として用いるべく、運用体制の構築等を協議・調整している段階にある。

2. 食鳥処理施設での衛生管理について

施設 A における衛生管理体制を視察した。本報告書では関連する画像の一部を図として示すこととする。同施設品質管理責任者及び規制当局担当者らからの情報として、当該施設では、チラー槽を計 4~5 槽設けているが、水温、殺菌剤濃度、pH の 3 要素を、槽別に自動管理していることが低減対策に大きく寄与していることを検証成績と共に視察することができた。また、来年度に向けては、使用する殺菌剤を変更するための調整を行っており、これに関連する事業者の成績等についても参照することができた。こうした成績を得る上で、NZ の当該施設では定期的なモニタリングシステ

ムを導入・運用しており、その採材等に関しても視察することができた。図1にはその概要を例示したが、当該施設ではカンピロバクターとサルモネラ属菌等を主たる検査対象と設定し、カンピロバクターについては、チラー冷却後のと鳥1羽を1検体として、ロットあたりN=3のサンプリングを行い、リンスパック方式による定性試験が実施されている状況を確認した。なお、検査終了後の検体は次亜塩素酸Na水で十分に洗浄した後、製品として元のレーンに戻されていた。

同施設における、脱羽からチラー槽に入るまでの工程では複数のシャワー装置がレーン上に設置されており、次亜塩素酸Naを連続的にシャワーリングすることで、表面汚染を顕すカンピロバクターやサルモネラ属菌を極力洗い流すような構造を導入していた。また、加工施設においては自動化が進んでおり、重量測定や大まかな部位選別等の作業は自動化されていた。但し、最終的なカット工程は手作業によるものであり、交叉汚染を完全に防止するには至っていないとの意見を品質管理者より得た。

この他、生鳥搬入に際しては、ブルーライド下で作業が行われており、掲示物として動物愛護に関する表示が作業所に掲示されていた。搬入にあたっては、作業者が直接生鳥に触れることなく、ベルトコンベアー上に鶏が搬入される構造・システムが採用されており、動物愛護の観点からの対応である旨の回答を得た。

NZ視察及び意見情報交換を通じ、我が国のカンピロバクター食中毒に係る情勢として、鶏肉が原因食品を占める割合はNZに比べより高い傾向にあることが明らかとなった。生食用食肉の規格基準策定や牛肝臓の生食提供禁止措置等を経て、2014年以降は特に牛肉に関連する本食中毒事例の割合は以前に比べて大きく減少しており、我が国におけるカンピロバクター食中毒の低減を推し進める上で、鶏肉のフードチェーンに関わる衛生管理対策の充実は必要不可欠な課題であるといえる。

食鳥処理施設においては、チラー槽の管理要件として3項目の管理を徹底すること、更には試験方法等、我が国においても参考となりうる知見が得られたことは大きな収穫であったと考える。EUをはじめとする欧米諸国、更には隣国である韓国においても、鶏肉の汚染実態を把握する上では、ふき取りではなく、と鳥1羽を1検体とするリンスパック法が採用されているため、国内での状況を海外に向けて発信していく上でも、今後は我が国における当該手法を用いた検査成績の集積が求められると思われる。

D. 考察



図1 . リンスパック法のための採材の一例

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

生食用食鳥肉の処理加工施設における衛生管理に関する研究

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
研究分担者	中馬猛久	鹿児島大学共同獣医学部
研究協力者	鹿島正文	鹿児島県保健福祉部生活衛生課
研究協力者	五十君静信	東京農業大学応用生物科学部
研究協力者	品川邦汎	岩手大学

研究要旨：本研究では、生食用食鳥肉の解体・加工処理を行う施設での工程管理手法に関する情報を収集するため、南九州地方の関連 2 施設を視察し、情報・意見交換を行った。施設 A については、大規模食鳥処理場であり、主に廃鶏をとさつ・放血・脱羽後、中抜き方式で解体処理を行い、部分肉について、表面を焼烙あるいはボイルしたものを生食用鶏肉として出荷していた。施設 B については、認定小規模食鳥処理場であり、同じく廃鶏を対象として、とさつ・放血・脱羽工程を経た後、と鳥表面を焼烙し、外剥ぎ方式にて部分肉を切り出し・カットしたものを生食用食肉として出荷していた。両施設での表面加熱手法の導入によるカンピロバクター低減に資する有効性を、実証を行う必要があると考えられる。

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。

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。

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。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おり、生産から消費に至るフードチェーンを通じ、ヒトに病態を顕す。特に、食鳥肉への汚染を制御するためには、食鳥処理場における衛生管理の充実が必要不可欠であり、カンピロバクター汚染低減に資する食鳥処理工程の確立が我が国を含めた世界各国において求められている。

こうした背景を鑑み、本分担研究では、南九州地方において、生食用鶏肉を取り扱う、食鳥処理施設での工程管理に関する情報を収集するため、視察を行ったので、その概要を報告する。

B. 研究方法

1. 食鳥処理施設における工程フローの確認

南九州地方の施設1は大規模食鳥処理場であり、施設2は認定小規模食鳥処理場であることを事前に把握した。両施設における食鳥肉の解体加工処理工程フローを整理することとした。

2. 当該施設における管理要件箇所の整理

両施設において、衛生管理上、留意する点について情報として提供を受けた。

C. 結果

1. 施設Aにおける解体加工工程の概要

大規模食鳥処理施設である施設Aでは、年間約200万羽の廃鶏を解体処理し、生食用鶏肉として出荷しているとの情報を得た。当該施設では、生鳥をフックに懸吊し、とさつ 放血 脱羽 中抜き 冷却(予備チラー・本冷チラー) カットまでを解体処理施設で実施していた。その後は、別棟の施設に部分肉を運搬し、加工処理を行っていた。当該施設では多様な鶏肉加工製品を製造していたが、その中にあって、生食用鶏肉製品については、使用する部位別に予め設定された条件の下、表面を焼烙またはポイルで加熱処理した後、別作業台にて一口大の大きさにカットされ、その後包装されていた。製品は、冷蔵または冷凍で出荷されていた。

2. 施設Bにおける解体加工工程の概要

認定小規模食鳥処理施設である施設Bでは、施設Aと同様、廃鶏を対象としていた。とさつ 放血 脱羽 冷却の工程を手動で行った後、と鳥をフックに懸吊し、ガスバーナーを用いて表面を焼烙していた。その後、外剥ぎ方式にて、モモ、ムネ、ササミ等を切り出し、部位別にトレイに移し、別室に運搬して、カット・包装され、製品化されていた。

D. 考察

鶏肉の解体加工処理工程は交叉汚染を招き得る工程の中で最も衛生管理に留意すべき箇所ととらえられている。一方で、食鳥処理工程では、経済・労力の両面から、内臓摘出を中抜き方式により自動化している場合が殆どであ

り、腸切れ等による腸管内容物の漏出を完全に制御することは困難な状況にある。本研究では、南九州地方にあり、生食用鶏肉を製造加工している、大規模および認定小規模食鳥処理施設を視察し、工程管理に関する情報収集を行った。

施設 A については、中抜き方式を採用しており、視察時においても腸管内容物の漏出も確認された。しかしながら、その直後に複数名の食鳥検査員による確認作業により、著しい汚染と鳥は除外されており、その後の冷却工程で使用していたチラー水の混濁の程度は低いものとして観察された。加工工程において最も注記すべき点としては、部分肉表面を焼烙またはボイルすることで、表面を汚染する微生物危害の管理を行っている点である。当該施設では、製品としての品質と安全性の両面を担保するための条件設定を行い、それぞれ部位別に加熱条件を設定していた。表面焼烙については、上下にガスバーナーを備えたベルトコンベアを用いており、同工程を経た部分肉は最終的に、焼きムラ等が生じないように、作業員により手動で最終的な焼烙が行われていた。こうした工程がどの程度、汚染低減に資するかについては、原材料、中間製品、製品ならびに施設環境等を対象としたパイロットスタディにより検証すべきと考えられる。また、表面焼烙工程後のカット工程においても交叉汚染等の発生にも留意すべきと考えられた。一方、一定の汚染率ではあるが、汚染菌数としては加熱用鶏肉に比べて低値を示すとの中馬らの報告からは、少なくとも当該施設で見られたような工程管理手法の普及・導入は鶏肉におけるカンピロバクター汚染低減に寄与するものと考えられる。今後、

関連施設事業者からの研究協力を継続的に得つつ、特に生食用食鳥肉の取扱いに関する情報を集積し、食鳥肉の安全確保に資する情報を提供していきたいと考える。

E. 結論

南九州地方に位置する、生食用鶏肉を取り扱う食鳥処理場では部分肉あるいはと鳥の表面を加熱処理した後、いわゆる“鶏刺し”製品を加工・出荷していた。また、施設 A では中抜き方式、B では外剥ぎ方式を採用していたが、視察対象となった施設 2 か所はいずれも廃鶏を主たる鶏生体として用いていた。廃鶏はブロイラー鶏等に比べ、飼育日数が長く、腸管内でのカンピロバクター菌数に関する知見収集は、当該生体を用いることに衛生学的な意義があるか見定める上で必要な事項と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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1A)。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1B)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

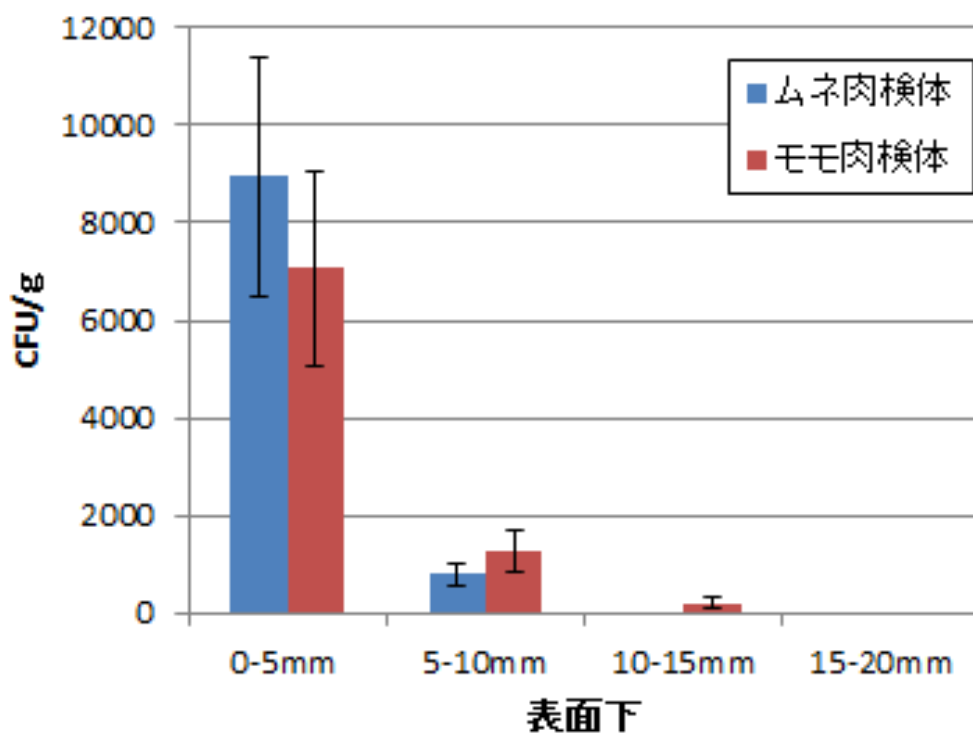
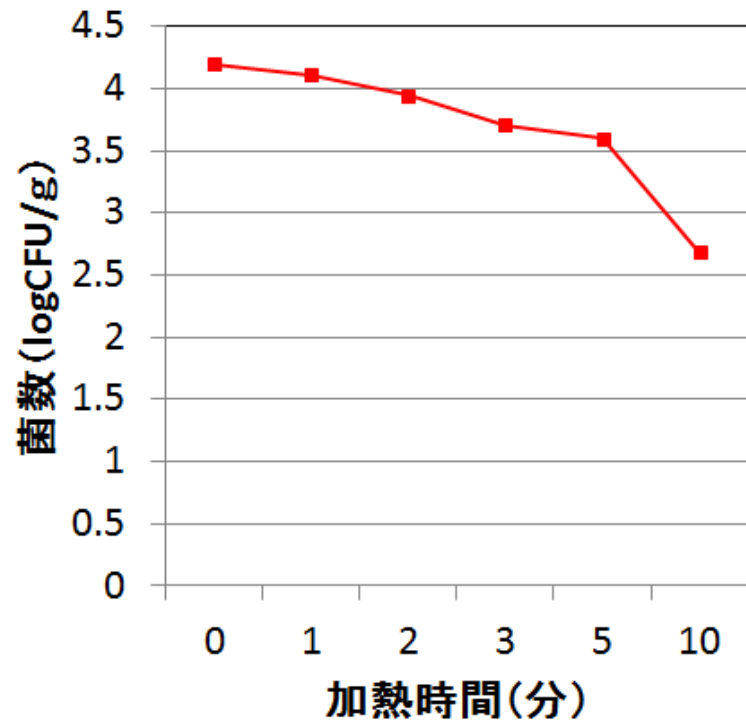


図1 . 鶏肉内部への *C. jejuni* の浸潤性 .

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

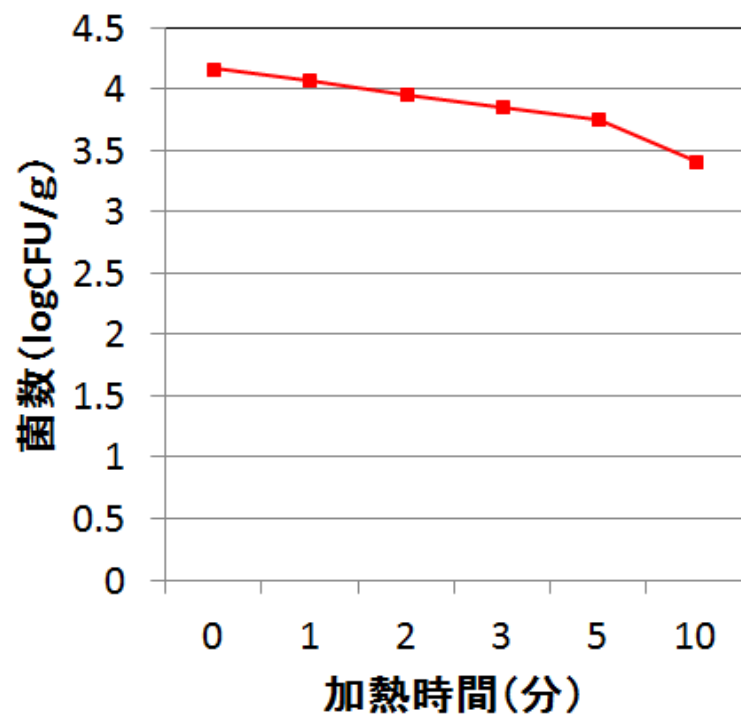


図2 . 85 温浴加熱を通じた鶏肉検体中のカンピロバクター生残性挙動 . A は鶏ムネ肉、B は鶏モモ肉での挙動を示す。

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。

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

分担研究者 中馬猛久

鹿児島大学共同獣医学部

研究要旨

前年度には、簡易的な MPN 法を用いて鹿児島県内に市販される鶏刺しのカンピロバクター汚染状況を調査した結果、加熱用鶏肉に比較して汚染菌数が著しく少なかったことを報告した。しかしながら、その具体的な菌数は明らかでないため、更なる調査が必要と考えられた。そこで、本年度は、鶏刺しを含む生食用、加熱用それぞれの市販鶏肉におけるカンピロバクター汚染菌数を MPN3 本法によって比較評価することとした。

鹿児島県内の小売店にて購入した生食用鶏肉 61 検体のうち、菌数が 0~10MPN/50g であったものは 53 検体、10~10²MPN/50g であったものは 5 検体、10²MPN/50g を上回ったものは 3 検体であった。一方、加熱用鶏肉 46 検体については、菌数が 0~10MPN/50g であったものは 20 検体、10~10²MPN/50g であったものは 12 検体、10²MPN/50g を上回ったものは 14 検体にのぼった。これらの成績から、加熱用鶏肉に比べて生食用鶏肉のカンピロバクター汚染菌数は概して低いことが明確化された。一般的に、カンピロバクター症の発症には数百個の菌の摂取が必要であるとされており、生食用鶏肉が本菌汚染を受けていた場合にも多くの場合には、最少発症菌数を下回るものと推定される。生食用鶏肉として供試された検体の成績を、加工業者ごとに比較検討したところ、10²MPN/50g を上回る汚染を示した 3 検体はいずれも検体数の少ない小規模加工事業所のものであり、事業者毎に汚染状況が異なる可能性も示唆された。これらのことから、生食用鶏肉については、適切な処理の実施を通じ、カンピロバクター汚染を一定の割合で制御しうると考えられた。今後、更に生食に供しうる鶏肉の製造加工工程における、適切な処理方法等について検討を行っていく必要があると思われる。

A. 研究目的

カンピロバクターは、世界中のヒトにおいて胃腸炎を引き起こす代表的な食中毒起因細菌である。我が国においても、カンピロバクター症は最も頻繁な細菌性食品媒介感染症となっている

ことは周知のとおりである。本菌汚染を受けた鶏肉製品は、カンピロバクター感染症の最も主要な原因食品と位置づけられており、実際に我が国において生産・流通される、鶏肉については、50%を超えるカンピロバクター汚染が報告され

ており、一定の割合で高濃度汚染も生じていると考えられている。

食鳥肉におけるカンピロバクター汚染制御については、養鶏場における衛生管理の向上と解体処理場における衛生管理手法の改善、更には流通段階での応用的手法の適用等を行うことで、一定の達成を果たしうるものと想定されている。カンピロバクター属菌は一般的に熱ストレスに感受性が高いため、家庭の調理プロセスによって容易に不活性化され得る。しかしながら、現時点においては、流通する鶏肉製品におけるカンピロバクター属菌の完全な除去を行い得る手法については確立されていない。

厚生労働省では、食の安全確保のために、牛肝臓の生食用としての提供を2012年より禁止する措置を実施してきたほか、豚肉及び同内臓肉についても十分な加熱調理が必要不可欠であることを販売事業者、飲食事業者、および消費者に向けて周知する等、食肉に関する規制を強化してきた。

一方で、南日本、特に宮崎、鹿児島両県では、鳥刺しとして、鶏肉を生食用として提供する郷土料理がある。鳥刺しは表面を焼烙あるいは湯引きした内部が加熱不十分な形態の鶏肉料理を指す。鳥刺しは当該地域では、普及している食品の一つであり、スーパーマーケット等でも販売されている。そのため、当該地域では、多くの消費者が家庭や飲食店で喫食する機会が多い。こうした食品の消費を介して、ヒト・カンピロバクター症が発生する可能性は否定できないが、鹿児島県下におけるカンピロバクター食中毒集団事例の発生は極めて少ないのが現状である。

こうした背景より、本研究では、MPN法を用いて、鹿児島県内において製造流通する生食用

鶏肉および加熱用鶏肉の汚染実態を定量的に比較検証を行い、本菌の汚染低減に資する手法の確立に向けた基礎知見の集積を図ることとしたので、報告する。

B. 研究方法

1. 検体

材料は鹿児島県内小売店8店舗にて購入した生食用鶏肉61検体、加熱用鶏肉46検体の計107検体とした。何れの検体についても、購入日のうちに、試験に供した。購入鶏肉製品については、購入・加工年月日、製品名、販売事業者名、加工事業者名等の情報を製品表示を根拠として記録した。加工事業者の規模はさまざまであり、計10事業者由来の検体を得ることができた。

2. MPN法(最確数法)

MPN3本法を用いカンピロバクターの汚染菌数を推定定量した。試験法の概要は図1に記す。まず、鶏肉50gをプレストン液体培地50mlの入った袋にいれ、ストマックにて十分に混和した。混和後のプレストン液体培地を10mlずつ3本の試験管に分注し、さらに1ml、0.1mlをそれぞれ10mlプレストン液体培地入り試験管に接種し、これらを42℃の微好気条件下にて48時間培養した。培養後は、培養液1白金耳をmCCDA培地上に塗抹し、再び42℃の微好気条件下にて48時間培養を行った。mCCDA培地上でカンピロバクター様の定型集落が認められたものについては、位相差顕微鏡を用いた菌体形態の観察、ならびに*C. jejuni*、*C. coli*同定のためのPCRを行い、陽性・陰性の判定を行った。1検体あたり計9本の培養を行っており、このうち、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、MPN 表を参考に、細菌数の推定を行った。

C. 研究結果

鹿児島県内小売店にて購入した生食用鶏肉 61 検体のうち、菌数が 0~10MPN/50g だったものは 53 検体、10~10²MPN/50g だったものは 5 検体、10²MPN/50g を上回ったものは 3 検体であった(表1)。加熱用鶏肉 46 検体のうち、菌数が 0~10MPN/50g だったものは 20 検体、10~10²MPN/50g だったものは 12 検体、10²MPN/50g を上回ったものは 14 検体であった(表1)。以上の結果から、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著しく低いことがわかった(図2)。生食用鶏肉の加工業者ごとに比較検討をしたところ、10²MPN/50g を上回る汚染のあった 3 検体は検体数の少ない業者に限定されていた(表2)。検体数が多い業者 A および B は汚染レベルが低かった。

D. 考察

昨年度の研究結果から生食用鶏肉のカンピロバクター汚染レベルが加熱用の鶏肉よりも低いことが予想されたが、その汚染レベルを精確に判定することはできなかった。そこで、本年度は MPN3 本法を用いて精確な汚染レベルを調査した。その結果、生食用鳥肉検体の多くはカンピロバクター陰性もしくは低汚染であることが明らかとなった。

高度汚染サンプルを除く、カンピロバクター陽性サンプルの MPN / 50g 値は 29 未満であった。これは、生食用として販売されている鶏肉が加熱用とは異なるラインで処理されていることを意

味するものと思われる。しかしながら、生食用鶏肉のうち 3 サンプルは 240 MPN / 50g を超えるカンピロバクターで汚染されていた。カンピロバクターのヒトへの感染は数百個の菌で成立しうることが知られており、これらの 3 つのサンプルは感染の危険性があるかもしれない。比較的高度に汚染されたこれら 3 サンプルは 2 つの小規模製造業者(F、G)のみで処理されたものであり、したがって、カンピロバクターによる汚染リスクは製造者の加工方法に依存する可能性があることから、厳しい管理によってカンピロバクターによる汚染を抑制できると考えられる。

鶏肉に対するカンピロバクターの混入を減らすための様々な方法が考えられ、第 1 にワクチン接種、バクテリオファージ、有機酸、第 2 にホタテガイ殻粉末、脱臭オリエンタルマスタード抽出物、塩素のと体または肉への直接処理がある。さらに、食品中の細菌増殖を抑制するために使用される凍結法もある。このように様々な方法が提案されてはいるが決定的な方法は未だ不明である。当該地方に流通する鳥刺しは表面が加熱焼烙された鶏肉であり、カンピロバクターによる汚染レベルを低く抑えることができている可能性が考えられる。

E. 結論

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

応用的制御手法として機能しうる一案と考えられる。

1.特許取得
なし

F. 健康危険情報

なし

2.実用新案登録
なし

G. 研究発表

1. 論文発表等

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

2.学会等発表

・「人・動物・環境の調和と共存：人獣共通感染症および食品由来感染症制御からのアプローチ」平成28年度空気調和・衛生工学会大会. 平成28年9月14日（鹿児島市）

・「鹿児島県内で市販される生食用鶏肉のカンピロバクター汚染状況」第65回日本獣医公衆衛生学会(九州). 平成28年10月16日（北九州市）

・「生食用と加熱用鶏肉におけるカンピロバクター汚染菌数の評価」第9回日本カンピロバクター研究会. 平成28年11月26日（三鷹市）

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

表1、各鶏肉のカンピロバクター汚染菌数

汚染菌数 (MPN/50g)	検体数	
	生食用	加熱用
<3	47	14
3	1	1
4	1	1
6	1	1
7	0	1
9	3	2
11	0	1
23	4	4
29	1	1
38	0	1
43	0	4
93	0	1
240	1	3
460	0	3
1100	0	2
>1400	2	6
合計	61	46

表2、生食用鶏肉加工業者による
カンピロバクター汚染度の比較

加工業社	検体数	カンピロバクター汚染度(MPN/50g)			
		0~10	11~100	101~1000	1001~
A社	17	17			
B社	25	22	3		
C社	4	4			
D社	4	4			
E社	3	2	1		
F社	3	1	1		1
G社	2			1	1
H社	1	1			
I社	1	1			
J社	1	1			

○材料

生食用鶏肉:61検体

加熱用鶏肉:46検体

計107検体

○方法

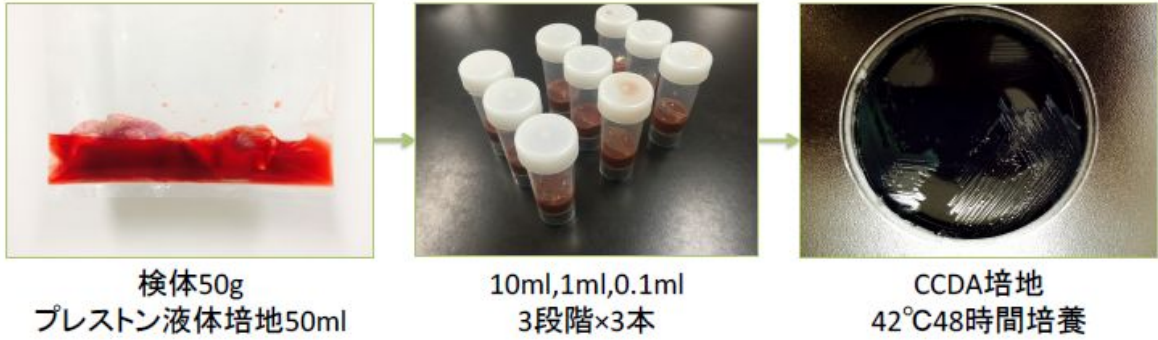


図1、材料と方法

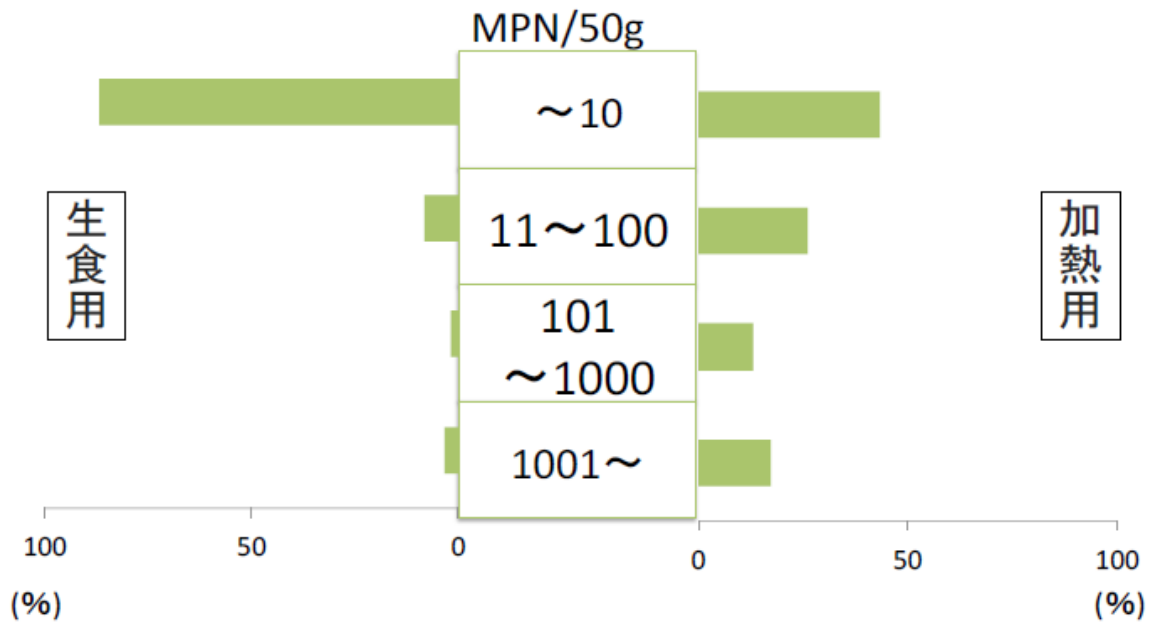


図2、カンピロバクター汚染菌数による検体数の分布

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

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 .	食鳥肉におけるカンピロバクター汚染のリスク管理に関する研究 .	食と健康	8	18-24	2016

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
森田幸雄、小林光士 .	わが国の食肉・食鳥肉の衛生状況 .	日本獣医師会誌	69	695-701	2015
藤田雅弘、遠藤健太郎、塩野雅孝、森田幸雄、朝倉宏、山本茂貴 .	食鳥処理場におけるカンピロバクター交差汚染状況 .	日本食品微生物学会雑誌	33	182-186.	2016
Ishihara K, Chuma T, Andoh M, Yamashita M, Asakura H, Yamamoto S.	Effect of climatic elements on <i>Campylobacter</i> colonization in broiler flocks reared in southern Japan from 2008 to 2012.	Poult Sci.	-	pew354	2016

