

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 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏

平成 30 (2018) 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30(2018)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

鶏盲腸便由来*Bacteroides*菌体抽出物投与によるカンピロバクター制御効果に関する研究

朝倉 宏 他

17

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

中抜き機による内臓破損がと体表面の衛生に及ぼす影響

森田 幸雄 他

21

酸化剤系殺菌剤の添加による中抜きと鳥のカンピロバクター汚染低減効果に関する研究

朝倉 宏 他

29

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

冷凍処理による鶏肉への品質影響に関する研究

朝倉 宏 他

35

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

39

カンピロバクター症をはじめとする食品媒介感染症被害実態の推定

窪田 邦宏 他

51

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

77

平成 29 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

森田 幸雄 東京家政大学

中馬 猛久 鹿児島大学

研究協力者

天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所

五十君 静信 東京農業大学

宇都 菜央 株式会社大山どり

尾崎 正秀 株式会社大山どり

春日 文子 国立環境研究所

川瀬 遵 島根県食肉衛生検査所

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

小松真由美 宮城県医師会健康センター

齊藤 剛仁 国立感染症研究所感染症疫学センター

桜井 芳明 宮城県医師会健康センター

坂田 淳子 大阪府立公衆衛生研究所

坂上 武文 株式会社ミロクメディカルラボラトリー

品川 邦汎 岩手大学

渋谷 俊介 株式会社 LSI メディエンス

島原 道範 株式会社大山どり

霜島 正浩 株式会社ビー・エム・エル

鈴木 智之 滋賀県衛生科学センター

滝 将太 株式会社ミロクメディカルラボラトリー

玉井 清子 株式会社ミロクメディカルラボラトリー

田村 克 国立医薬品食品衛生研究所

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

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

(敬称略、五十音順)

平成 29 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2養鶏農場の協力を得て、前年度までにカンピロバクターの生存・増殖抑制作用があるとされた鶏盲腸便由来 Bacteroides 株菌体抽出物を鶏生体に飼料切替期(前期から後期飼料、後期から休薬飼料の2期)に投与したところ、出荷齢プロイラー鶏盲腸便中のカンピロバクター菌数は平均対数個/g 減少を示し、投与による低減効果が認められた。(2)食鳥処理段階では、中抜き機の適切な管理と運用によりと鳥表面への腸内要物の汚染が低減へとつながることを示した。また、食品添加物として平成28年10月より食鳥肉表面の殺菌に使用可能となった、過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた中抜きと鳥の浸漬処理は次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた場合よりも有意にカンピロバクター汚染菌数を低減させることを定量的に示した。(3)加工流通段階では、鶏肉の冷凍処理に伴う肉質への影響を物性試験により評価し、空冷式の緩慢冷凍処理ではドリップ率が高まる傾向にあったものの、急速冷凍処理は冷蔵と同等のドリップ液漏出を示し、その活用は本菌汚染低減と品質保持の両面から利点として挙げられた。(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、同地域の認定小規模食鳥処理場並びに生食用食鳥肉加工施設での工程別汚染動態を調査し、解体処理工程直後に湯引きや焼烙等の加熱工程を設定することが食鳥肉の本菌汚染低減に資することを明らかにした。

この他、平成29年度厚生労働省による『食鳥肉における微生物汚染低減策の有効性実証事業』を支援すると共に、海外情勢等を含めて、食鳥肉におけるカンピロバクター汚染低減に向けた事例集の作成にあたった。

分担者

森田 幸雄 東京家政大学

中馬 猛久 鹿児島大学

研究協力者

天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所

五十君 静信 東京農業大学

宇都 菜央 株式会社大山どり

尾崎 正秀 株式会社大山どり

春日 文子

川瀬 遵

窪田 邦宏

熊谷 優子

倉園 久生

小西 良子

小松真由美

齊藤 剛仁

桜井 芳明

国立環境研究所

島根県食肉衛生検査所

国立医薬品食品衛生研究所

国立感染症研究所

帯広畜産大学

麻布大学

宮城県医師会健康センター

国立感染症研究所

宮城県医師会健康センター

坂田 淳子	大阪府立公衆衛生研究所
坂上 武文	ミロクメディカルラボラトリー
品川 邦汎	岩手大学
渋谷 俊介	LSI メディエンス
島原 道範	大山どり
霜島 正浩	ビー・エム・エル
鈴木 智之	滋賀県衛生科学センター
滝 将太	ミロクメディカルラボラトリー
玉井 清子	ミロクメディカルラボラトリー
田村 克	国立医薬品食品衛生研究所
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
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

(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依然として減少傾向を示すことなく多発しており、その対策は大きな社会的課題となっている。コーデックス委員会では、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おり(CAC/GL 78-2011)、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た上で、来年度初頭の発出に向け、改正作業が行われているところである。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

鶏の生産段階におけるカンピロバクター汚染率は総じて高く、特に休薬期間を経た出荷時に急激な菌数の増加が生じるとされる。農場への導入時(幼雛期)には本菌が陰性であるが、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との報告もある。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由来の鶏肉の多くは高率に本菌汚染を受けている。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

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チルス属菌等、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。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、現在も解決されていない世界的課題であるが、一般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、種々の腸内菌叢の存在も見出されつつあり、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。

本分担研究では、出荷時齢のブロイラー鶏を対象として、昨年度までに見出されたカンピロバクターの生存増殖性に抑制効果を示した、鶏盲腸便由来 *Bacteroides* 属菌株の不活化菌体抽出物を2生産農場で投与し、腸管内容における本菌の定量的動態を比較解析したので報告する。

(2) 食鳥処理段階

1) 中抜き機による内臓破損がと体表面の衛生に及ぼす影響

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。カンピロバクターは鶏の腸管内に生息していることから、食鳥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。

本年は鶏の内臓摘出処理時におけると体の微生物汚染実態、および汚染と体表面の細菌数について調査を行ったので報告する。

2) 酸化剤系殺菌剤の添加による中抜きと鳥のカンピロバクター汚染低減効果に関する研究

平成28年10月に過酢酸製剤や亜塩素酸ナトリウ

ム等を食鳥肉へ食品添加物として使用することが認められた。これを受け、本分担研究では中抜きと鳥を用いてカンピロバクター・ジェジュニの添加回収試験を行い、過酢酸製剤ならびに亜塩素酸ナトリウム溶液を食鳥処理工程の冷却水に適用した場合の本菌殺菌効果に関する定量的知見を得ることを目的として検討を行ったので報告する。

(3) 加工・流通段階

コーデックス委員会が定めた食鳥肉の衛生対策ガイドライン(CAC/GL 78-2011)では、冷凍処理が加工流通段階における食鳥肉中のカンピロバクター汚染低減効果を有する一手法として挙げられており、実際にアイスランド、ニュージーランド、デンマークでは、法的拘束力を有する手法としても採用されている。本研究ではこれまでに冷凍処理が我が国で生産される鶏肉中のカンピロバクター汚染低減に有効であることを定量的に示してきた。実際に、我が国が輸入する鶏肉は概して冷凍処理が施されており、国産の冷蔵流通される鶏肉に比べて本菌汚染率が低いとする報告もある。

しかしながら、輸入冷凍鶏肉の多くはドリップ率が高い等の声もあり、品質面で課題があるとの指摘もある。こうしたことから本分担研究では、冷凍処理として急速冷凍処理及び空冷式の冷凍庫を用いた緩慢冷凍処理を対象に物性試験を行い、処理後の物性変化について冷蔵鶏肉との比較を行ったので報告する。

(4) 流通・消費段階

鹿児島県や宮崎県では、鶏肉(主にもも肉やむね肉)を湯通しするか、あるいは表面を炙るなどして、タタキにして食する文化が根付いている。これがいわゆる「鶏刺し」や「鶏たたき」などといった名称で両県のスーパー等の小売店に日常的に並び、広く親しまれている。同地域で加工される鶏刺しは主に廃用となった種鶏(ブロイラーの生産に用いられた繁殖目的の肉用種であり、飼育日数がおよそ450日前後)を原料としており、日本各地から加工場へ集められている。現在、日本の様々な地域において

飲食店などで鶏刺しが提供されており、鶏刺しを食する機会は南九州地域に限らず日本各地に広がっている。

鹿児島県や宮崎県では、それぞれ「生食用食鳥肉の衛生基準」、「生食用食鳥肉の衛生対策」が独自に策定され、関連業者に周知されている。両県では流通量の多さに対して鶏刺しによる食中毒の報告は極めて少なく、衛生管理の行き届いている業者が多いものと考えられる。

我々は平成28年度までの研究で、鹿児島県で市販されている生食用鶏肉(鶏刺し)と加熱用鶏肉のカンピロバクター汚染菌数について調査を行った。その結果、生食用鶏肉では加熱用鶏肉と比較して汚染が著しく低い傾向がみられ、鹿児島県で加工される鶏刺しは概ねカンピロバクターによる汚染が制御されていることが示唆された。しかしながら、鶏刺しの加工工程においてカンピロバクターの汚染低減につながる施策についてのデータは未だない。

そこで本年度は、鶏刺し加工において施される表面の加熱(湯通し、焼烙)がカンピロバクター汚染低減に与える効果について検討することを目的とした。認定小規模食鳥処理場(年間処理羽数30万羽以下)で食鳥を解体及び加工する業者と大規模食鳥処理場(年間処理羽数30万羽超)で解体された食鳥を加工する業者の2つの加工形態について検討した。前者は調査1、後者は調査2として述べる。

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29年9月～11月の期間、九州地方にあるA/B農場の協力を得て、同農場で搬入後、飼養される肉用鶏の盲腸便を時系列を追って採材した。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量検出試験(次項)に供した。

2) *B. fragilis* 不活化抽出物の投与

BHIS broth で培養した *B. fragilis* an-51 株由来菌体破碎抽出物を凍結乾燥品として、上記農場に送

付し、飼料切替時期(前期から後期飼料への切り替え、約24日齢;後期から休薬飼料への切替時期、約33日齢)にそれぞれ飲水に添加した。同時に搬入・飼育される鶏群については陰性対照として設定した。

3) 定量検出試験

盲腸便検体1gを速やかに9mLの滅菌リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)に懸濁し、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・陰性の判定を行い、陽性集落数から検体1gあたりの菌数を求めた。また、これと並行して、盲腸便検体懸濁液1mlを9mL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後、PCR法によるスクリーニング試験に供し、カンピロバクターの陽性・陰性判定を実施した。

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) 中抜き機による内臓破損がと体表面の衛生に及ぼす影響

1) 食鳥処理場に搬入される鶏の盲腸中のカンピロバクター・サルモネラの検出状況

大規模食鳥処理場を訪問し6つの搬入ロット(午前中1ロット、午後1ロット、計3日間)の盲腸内容を1ロットあたり5検体ずつ採取し、カンピロバクターとサルモネラの検査を実施した。

カンピロバクターの定性検査方法:盲腸内容10gを100mLのプレストン培地に接種し、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 X 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た。

サルモネラの定性検査方法:盲腸内容10gを100mLのRV培地(Oxoid)に接種し、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 24 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た。

2) 処理ロットにおける各処理工程ごとの腸内容物汚染や腸の破損の発生率と細菌検出状況

大規模食鳥処理場を訪問し 6 つの搬入ロット（午前中 1 ロット、午後 1 ロット、計 3 日間）について処理工程の「肛門抜き」「肛門前腹部の切開」「内臓摘出後」の 400 体以上のと体について、腸内容物の汚染や腸の破損の有無を観察した。

各ロットのチラー前の中抜きと体のモモ部（5cm×5cm）をふき取り綿棒（関東化学）でふき取った。そのふき取り検体を持ちてカンピロバクターおよびサルモネラの定性検査を試みた。カンピロバクターおよびサルモネラの定性検査は前述のとおりである。大腸菌数、大腸菌群数、一般生菌数の測定についてはペトリフィルム（3M）を用いた。菌数の平均は対数平均を実施し、有意差の検定は t 検定を実施し、5%未満の危険率の場合を有意差ありとした。

(2) 酸化剤系殺菌剤の添加による中抜きと鳥のカンピロバクター汚染低減効果に関する研究

1) 殺菌剤の調整：過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウムの調整は使用 10 分前に行った。特に亜塩素酸ナトリウムについては殺菌性を高める為、1.428g/4mL の原液に、10mL の 1M クエン酸を添加後、10L 容の水道水に加え、十分に攪拌させ、温度及び pH 値を確認しつつ調整した。比較対照及びブランクとしては、次亜塩素酸ナトリウム溶液及び水道水を用いた。

2) 中抜きと鳥を用いた添加回収試験：カナマイシン耐性を示す *C. jejuni* 株を約 3 kg 重量の中抜きと鳥表面に接種し 4 で 20 分間静置した。各殺菌剤を含む浸漬液中で 30 分間処理した後、検体を大気中で 5 分間静置し、残留殺菌剤の蒸散を促した。その後、PBS200 mL と共に、ストマッ

カー袋に加え、1 分間十分に手揉みして表面洗浄液を得た。同液に終濃度 0.1% のチオ硫酸 Na 溶液を加え、遠心分離（2,160 x g、20 分間）を行った。その後、得られた沈渣を 2.5 mL の PBS で再懸濁し、mCCDA 寒天培地および標準寒天培地、VRBG 寒天培地に塗布し、各条件にあわせて培養を行うことで、被験株及び衛生指標菌（生菌数、腸内細菌科菌群数）の生存性を評価した。

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) 鶏肉検体及び冷凍処理

朝挽きの国産鶏ムネ肉（約 400g 重量/検体、大きさの平均は 14.2cm x 13.2 cm x 2.8 cm）を入手し、1 時間以内に冷蔵温度帯で当所へ搬入し、速やかに冷凍・冷蔵処理に供した。冷凍処理については、一昨年度の報告に示した急速冷凍処理（-30 のエタノールをベースとする溶液に浸漬させる方法）、緩慢冷凍処理（-20 を設定温度とする空冷式の家庭用冷凍庫を用いた）並びにチルド（4 保存）の 3 群に分けた（各群につき N=3）。各群とも 3 時間の処理を行い、冷凍処理 2 群については -20 で、冷蔵処理群については 4 のまま、それぞれ約 20 時間更に保存後、物性試験に供した。

2) 物性試験

鶏肉の物性試験項目として、ドリップ率、遠心遊離水分率及び破断応力を用いて、日本家畜改良事業団の作成した mmm に準じた方法により検討した。

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

調査 1：認定小規模食鳥処理場の処理工程におけるカンピロバクター汚染菌数の評価

1) 材料の採取

鹿児島県内の認定小規模食鳥処理場 1 か所にて生食用として解体・加工された食鳥について、1 度に 6 羽を対象として 5 度の採材を実施し、計 30 羽より材料を得た。搬入前の生体から、滅菌綿棒を用いて総排泄腔よりスワブ（直腸スワブ）を採取した。

さらに、脱羽後、チラー後、焼烙後のと体表面 25 cm² (5 cm×5 cm) をワイプチェック (SATO KASEI KOGYOSHOU, Co., Ltd.) により拭き取った。

5 度の採材のうち、前半 2 度と後半 3 度はそれぞれ異なる食鳥処理の条件下で行った。1 度目、2 度目の採材の際はチラー水を取り替えたばかりの真新しい状態で処理を行い、3 度目～5 度目の採材は約 70 羽～80 羽を既処理のチラー水を使用した処理中に実施した。いずれもチラー水調製時の次亜塩素酸ナトリウム濃度は 100 ppm であった。

2) カンピロバクターの分離・同定及び MPN 法によるカンピロバクター数の推定

採取した直腸スワブについて、カンピロバクターの存在の有無を調べるため、プレストン液体培地 10 ml に接種し培養後、バツラー培地 (Oxoid, Ltd.) に画線塗布した。と体表面ふき取り材料は、MPN 3 本法によりカンピロバクター数の推定を行った。ワイプチェック原液から、滅菌生理食塩水を溶媒として 10 倍、100 倍希釈液を調製した。この 3 段階の溶液を 1 検体当たり各濃度 3 本ずつ、計 9 本のプレストン液体培地 10 ml に接種した。培養後、バツラー寒天培地に画線塗布した。直腸スワブ、ふき取り材料のいずれも、バツラー寒天培地上のカンピロバクター様コロニーについて、位相差顕微鏡を用いてらせん状桿菌の存在を確認した上で MH 寒天培地 (Oxoid) に画線塗布し、純培養した。この一連の菌分離にあたって、培養は好気条件下、42、48 時間で実施した。種の同定にはダイレクトコロニー-PCR を用いた。

3) PCR によるカンピロバクターの種同定

C. jejuni 特異的プライマーとして VS15、VS16 を用い、*C. coli* の特異的プライマーとして CC18F、CC519R を用いた。これら 4 種のプライマー (いずれも 2 pmol/μl) をそれぞれ 2 μl ずつ、EmeraldAmp PCR Master Mix (TAKARA BIO) 10 μl、滅菌蒸留水 2 μl、合わせて 20 μl を 1 検体あたりの反応液とし、これに 1 白金線量のコロニーを加えた。陽性コントロールとして、過去に同定済みの *C. jejuni* 株、*C. coli* 株からそれぞれ抽出

した DNA を用いた。PCR 反応後、アガロースゲル中で電気泳動を行い、増幅サイズを確認した。

4) *E. coli* 数、大腸菌群数、一般生菌数の算定

E. coli 数および大腸菌群数算定にはペトリフィルム EC プレート (3M)、一般生菌数算定にはペトリフィルム AC プレート (3M) を指示書に従い、各菌数を求めた。

調査 2 : 大規模食鳥処理場を通じて加工される生食用鶏肉におけるカンピロバクター汚染菌数の評価

1) 材料の採取

鹿児島県内の大規模食鳥処理場 1 か所において解体されたのち、加工場へ搬入され、生食用として加工された食鳥肉 (もも肉、むね肉) について調査を行った。2017 年 6 月と 8 月に 1 度ずつ、計 2 回採材を実施した。採材を行った加工場の工程表を図 3 (もも肉)、図 4 (むね肉) に示した。搬入後 (原料)、加熱後 (もも肉は焼烙後、むね肉はボイル後)、スライス後、包装後 (製品) からそれぞれ、もも肉 3 検体、むね肉 3 検体ずつ (いずれも同一農場) 採取し、2 度の採材で 2 農場・合計 48 検体 (もも肉、むね肉とも各 6 検体×4 工程) の材料を得た。

2) MPN 法によるカンピロバクター数の推定

検体 25 g をプレストン液体培地 225 ml に入れてストマッキングし、ここから 10 ml を 3 本分注すると共に、9 ml、9.9 ml プレストン液体培地にストマッキング液をそれぞれ 1 ml、0.1 ml 加え希釈液を 3 本ずつ調製した。これらを培養後、1 白金耳量をバツラー培地に画線塗布した。以降のカンピロバクター分離・同定法および培養条件は調査 1 に準ずる。

3) PCR によるカンピロバクターの種同定

調査 1 に準ずる。

4) *E. coli* 数、大腸菌群数、一般生菌数の算定

調査 1 に準ずる。

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

2 農場 (A・B) で *B. fragilis* 菌体由来不活化抽出物投与群及び非投与群を設定し、盲腸内容物 1g 中のカンピロバクター菌数を求めたところ、出荷時齢における同菌数は A 農場では非投与群が 1.46×10^9 CFU/g (平均)、投与群が 1.16×10^7 CFU/g となり、約 2 対数個以上の減少が認められた。また、B 農場では非投与群が 1.15×10^6 CFU/g と A 農場に比べて少数の自然汚染を顕していたが、投与群では 8.40×10^3 CFU/g と A 農場での成績と同様に 2 対数個/g 以上の低減を示した。

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) 中抜き機による内臓破損がと体表面の衛生に及ぼす影響

1) 食鳥処理場に搬入される鶏の盲腸中のカンピロバクター・サルモネラの検出状況

6 つの搬入ロット (A~F) の盲腸内容の 30 検体を検査したところ、全ロットからカンピロバクターが検出された。ロット A・C・F は 5 検体中 5 検体から、ロット B と E は 5 検体中 4 検体から、ロット D は 5 検体中 1 検体からカンピロバクターが検出された。一方、サルモネラは全ロットで陰性であった。

2) 処理ロットにおける各処理工程ごとの腸内容物汚染や腸の破損の発生率と細菌検出状況

処理ロットにより、腸内容物汚染や腸破損の発生率は大きく異なっていた。「肛門抜き」工程では最大 17% から最少 1% の腸内容物汚染がみられた。「肛門前腹部の切開」工程での腸破損は最大 30% から最少 1% の腸内容物汚染、「内臓摘出後」の、と体への腸内容物汚染は最大 44% から最少 0.5% であった。また、これらの汚染や破損は同様の傾向を示し、ロット A が一番高く、ロット F が一番少なかった。チラー前の中抜きと体モモ部からは、ロット B では 5 検体中 4 検体、ロット C では 5 検体中 3 検体、ロット A と E では 5 検体中 1 検体からカンピロバクターが検出

された。ロット D と F からはカンピロバクターは検出されなかった。サルモネラは全てのロットで陰性であった。

内臓摘出後におけると体上での腸内容物汚染を 10% 以上または以下のロットに分けた際の大腸菌、大腸菌群、一般生菌の各菌数は、10% 以上のロットにおける大腸菌、大腸菌群、一般生菌の平均値はそれぞれ 7.6 個/ml、8.1 個/ml、392.2 個/ml であった。一方、10% 以下腸内要物汚染を呈したロットではそれぞれ 1.6 個/ml、1.9 個/ml、118.3 個/ml となり、前者に比べて低値を示した。

(2) 酸化剤系殺菌剤の添加による中抜きと鳥のカンピロバクター汚染低減効果に関する研究

添加回収試験を通じた中抜きと鳥におけるカンピロバクター汚染に対する各種殺菌剤の低減効果は、100ppm の次亜塩素酸ナトリウム浸漬で、2.08 logCFU/羽の減少、水道水処理では 1.03 logCFU/羽の減少であったのに対し、50ppm 及び 100ppm の過酢酸製剤はそれぞれ 2.69 logCFU/羽及び 3.29 logCFU/羽の減少を示した。50ppm 過酢酸製剤処理による中抜きと鳥検体の外観変化は認められなかった。過酢酸製剤処理液の pH 範囲は、25ppm で pH4.6、50ppm で pH4.3、100ppm で pH4.0、200ppm で pH3.8 であった。

一方、亜塩素酸ナトリウム溶液 (いずれも pH2.5, 10, 50, 150ppm) を用いた 30 分間の浸漬により、全ての濃度で被験菌株は回収されず、4.75 logCFU/羽以上の低減効果があることが示された。濃度非依存性の汚染低減効果から、次に酸性化によるものと想定し、複数段階の pH から成る PBS 溶液中での本菌生存性を評価したところ、pH4.0 以下の条件で有意な減少を示すことが明らかとなった。

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

平均 400 g 重量の鶏ムネ肉検体について急速

冷凍処理群のドリップ率は 0.96% となり、冷蔵処理群と同等の数値を示した (0.93%)。一方で、緩慢冷凍処理群のドリップ率は 2.97% と他二群に比べて有意に高値を示した。破断応力及び遠心遊離水分率については、各群間で統計学的に有意差は認められなかった。

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

(1) 調査 1 : 認定小規模食鳥処理場の処理工程におけるカンピロバクター汚染菌数の評価

あるロットにおける成績として、脱羽後のと体からは最大で $100 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ の *E. coli* が検出された。しかしながら、同と体を含む全ての検体でチラー処理後には $7 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ 以下まで減少し、焼烙後には全く検出されなかった。大腸菌群も同様に、脱羽後に比べ、チラー処理後には全検体で菌数減少が認められた (平均 $46.3 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ から $6.5 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ へ)。また、*E. coli* も同様に焼烙後には全く検出されなかった。

脱羽後に最も大きな値を示したと体からは $2.1 \times 10^2 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ の一般生菌が検出されたが、焼烙後には平均 $1.0 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ にまで抑えられた。

カンピロバクターは直腸スワブ検体は全て陽性を示し、脱羽後と鳥では 12 検体中 5 検体が陽性であった。一方、チラー後および焼烙後の検体ではすべてカンピロバクター陰性であった。

他ロット 18 検体のうち 13 検体では、脱羽後に *E. coli* 数は $10 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ を下回った。チラー後に 1 検体のみ $41 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ を示したのもみられたが、これを除く 17 検体では $5 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ 以下であった。焼烙後には全検体で *E. coli* 陰性を示した。

一般生菌数は検体により様々な値を示し、脱羽後に $8.3 \times 10 \sim 4.1 \times 10^2 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ の範囲で検出された。チラー後では 18 検体中 12 検体が $1.0 \times 10^2 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ 未満と低値が多かったが、4 検体では $10^3 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ を超えていた。しかしながら、焼烙後には全検体で $6 \text{ cfu}/25\text{cm}^2$ 以下を示した。

上記ロットの直腸スワブからカンピロバクター

は 7 羽のみ陽性となった。鶏群別では 9 月採材の 6 羽では 5 羽 (陽性率 83%)、11 月採材の 6 羽では 2 羽 (陽性率 33%)、2 月採材の 6 羽では全て陰性となり、季節性の関与が改めて示された。なお、と体ふき取り検体は、工程に関わらずいずれもカンピロバクター陰性であった。

(2) 調査 2 : 大規模食鳥処理場を通じて加工される生食用鶏肉におけるカンピロバクター汚染菌数の評価

1) もも・むね肉における各菌数の推移

もも肉

もも肉原料からは $0 \text{ cfu}/\text{g} \sim 4.1 \times 10^2 \text{ cfu}/\text{g}$ の *E. coli* が検出された。焼烙後に $2.8 \times 10^3 \text{ cfu}/\text{g}$ を示した検体も 1 検体のみ認められたが、他の 5 検体は全て陰性であった。スライス加工後検体及び包装後製品からは全く検出されなかった。

同上原料から大腸菌群は、 $9.0 \times 10 \text{ cfu}/\text{g} \sim 6.8 \times 10^2 \text{ cfu}/\text{g}$ の範囲で検出された。焼烙後の 4 検体からは大腸菌群を検出しなかったが、1 検体のみ $4.0 \times 10^3 \text{ cfu}/\text{g}$ の検出を認めた。スライス加工後の 2 検体からは $1.0 \times 10 \text{ cfu}/\text{g}$ の大腸菌群が検出されたが、他の 4 検体は何れも陰性であった。包装後製品からは最大 $7.0 \times 10 \text{ cfu}/\text{g}$ の大腸菌群を検出したが、3 検体は陰性であった。

同上原料 6 検体のうち 4 検体で $10^4 \text{ cfu}/\text{g}$ を上回る一般生菌が検出された。焼烙後には 1 検体で $3.8 \times 10^4 \text{ cfu}/\text{g}$ を検出したものの、他は概ね低値であり 2 検体は不検出であった。スライス加工後及び包装後製品検体からはそれぞれ最大で $7.4 \times 10^2 \text{ cfu}/\text{g}$ 、 $1.5 \times 10^3 \text{ cfu}/\text{g}$ の検出が認められた。

もも肉原料の 1 検体で $4.6 \times 10^2 \text{ MPN}/10\text{g}$ のカンピロバクターを検出した。これに次ぐ高値は $1.5 \times 10 \text{ MPN}/10\text{g}$ であり、概ね低値であった。また、焼烙後の検体からカンピロバクターは検出されなかった。

むね肉

むね肉原料の検体から検出された *E. coli* 数は、最大で $4.0 \times 10 \text{ cfu}/\text{g}$ であった。原料の 6 検体の

うち4検体から *E. coli* は検出されなかった。また、加熱後、スライス後、製品からは何れも検出されなかった。

大腸菌群は、むね肉原料の検体から 2.0×10 cfu/g ~ 3.7×10^2 cfu/g の範囲で検出された。加熱後の検体からは大腸菌群は検出されなかった。スライス後、製品の検体ではそれぞれ5検体、4検体で大腸菌群陰性であったほか、最大でも 1.0×10 cfu/g に抑えられていた。

むね肉原料から検出された一般生菌数は、 1.6×10^4 cfu/g を記録した1検体を除いて 5.0×10^3 cfu/g 以下であった。加熱後には、検出されなかった2検体を含め、すべての検体で 10^2 cfu/g 未満であった。

カンピロバクターは、原料から製品までのすべての検体で陰性であった。

2) もも肉とむね肉の間における汚染度の比較

各工程におけるもも肉とむね肉の2群間の汚染度を比較するため、各菌数平均値の差を解析した。解析に対数値を用いるため、算定値に0が含まれなかった原料の大腸菌群数、原料の一般生菌数および製品の一般生菌数について検討を行った。算定値の常用対数をとると、原料の大腸菌群数はもも肉で平均 $2.4 \log$ cfu/g、むね肉で平均 $2.0 \log$ cfu/g であった。また原料の一般生菌数はもも肉で平均 $4.1 \log$ cfu/g であったのに対してむね肉では平均 $3.5 \log$ cfu/g であった。製品の一般生菌数はもも肉で平均 $2.6 \log$ cfu/g、むね肉で平均 $1.7 \log$ cfu/g であった。対数値を用いてF検定を行ったところ、3者とも2群間で分散に有意差が認められなかったため ($p > 0.05$)、スチューデントのt検定を行った。その結果、原料の一般生菌数および製品の一般生菌数において、もも肉とむね肉の群間に平均値の有意差が認められた ($p < 0.05$)。

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

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、昨年度の成果を受け、*Bacteroides* 属由来生理活性物質がカンピロバクター定着に示し得る生物学的役割を検討した。対象2農場において、投与群は非投与群に比べて有意な菌数低減を示したことは、その普遍性と今後の応用性が期待されると考えられる。一方で、その投与方法として今回実施した内容が最適であるかどうかは定かではなく、今後適用方法を含めた改良評価が実用化には必要不可欠な課題と考える。

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) 中抜き機による内臓破損がと体表面の衛生に及ぼす影響

大規模食鳥処理場に搬入された6ロットはカンピロバクターを保菌しており、養鶏場から出荷される段階での高度汚染が想定された。1ロットにつき5検体を検査した本調査においても5検体全てから検出されるわけではなく、ロットの中にもカンピロバクターを保菌している個体、保菌していない個体があることが再確認された。

内臓摘出装置の調整や定期的なメンテナンスにより、食鳥処理工程での腸内容物汚染や腸破損の発生率は大きく変化することが判明した。また、「肛門抜き」工程で腸内容物汚染が多いものは、その後の「肛門前腹部の切開」での腸破損や、「内臓摘出後」のと体への腸内容物汚染も同様に発生率が高かったことは、こうした内臓摘出に関わる機器の調整ならびに使用方法の適正化を持続的に実施することが食鳥肉における微生物汚染低減に寄与すると目される。具体的には、日々の内臓摘出装置の調整、定期的なメンテナンスなどが挙げられよう。

(2) 酸化剤系殺菌剤の添加による中抜きと鳥のカンピロバクター汚染低減効果に関する研究

過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウム溶液による

浸漬は、中抜きと鳥におけるカンピロバクター汚染菌数の低減に有効であることを示す成績が得られた。その低減効果の大きさは次亜塩素酸ナトリウム溶液等に比べて大きかったことから、中抜き後のチラー槽へ添加する殺菌剤については各施設の状況に応じて検討する余地があると思われる。

また、両薬剤は共に酸化剤としての性質を有しており、本研究の成績は、pHを酸性側(pH4.0未満)に傾けることのみによってもカンピロバクター汚染菌数を一定の割合で低減させる効果が得られることを示唆していると思われる。過酢酸製剤には酢酸等が含まれているほか、亜塩素酸ナトリウム溶液の調整にはクエン酸等が用いられていることから、こうした有機酸の応用はより実用性に富むものとなるかもしれない。

一方で、本研究で用いた両薬剤は共に複合的な殺菌効果を示し得る構成となっている。後者は混合時に有毒ガスを生じる可能性が指摘されており、食鳥処理施設等での使用を考える上では、自動混合注入装置の導入が最適とは思われるが、ペットボトル等を用いた手動の混合も有効と思われる。

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

本研究では、急速冷凍・緩慢冷凍処理に伴う鶏むね肉の物性変化に関する比較を行った。急速冷凍処理によるカンピロバクターの汚染低減効果は緩慢冷凍と同様であったものの、物性変化として急速冷凍は緩慢冷凍に比べ、冷蔵処理と同等のドリップ発生を抑える利点が示されたことから、今後の利活用が期待される。カンピロバクターは大腸菌やサルモネラ属菌等に比べると、冷凍処理に極めて弱く、汚染低減効果は明確に表れる。一方、菌株間では抵抗性に差異も認められているため、今後はこうした形質の差異を裏付ける分子基盤の特定を行い、その基盤の破綻を助長する手法の開発等へつなげることができれば、より大きな低減効果を有する手法の策定へとつながることも期待されよう。

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

本研究において、もも肉、むね肉ともに加熱後の検体からカンピロバクターは検出されなかった。鶏レバーにおいては、カンピロバクターを完全に殺菌するには中心温度70℃以上を2分~3分間持続することが必要であるとする報告がある。一方、鶏ミンチのパティ(厚さ1.2cm)について行われた研究では、人工的にカンピロバクターを接種した検体と接種しない検体をそれぞれフライパンで加熱した際、中心温度がそれぞれ57.5℃、52.1℃に達したときにカンピロバクターが検出限界以下(<10cfu/g)となったことが報告されている。本研究では肉の温度について計測していないものの、もも肉焼烙の工程で加工場が定める目標値は表面70℃以上となっている。レバーは胆管等を通して表面だけでなく内部までカンピロバクターに汚染されていることがあるため、中心まで加熱することが求められる。一方、もも肉やむね肉は表面汚染の制御が重要であり、本研究の結果から、湯通し・焼烙により表面を70℃以上に加熱することが一つの目安になるとと思われる。

原料のもも肉から検出された*E. coli*数は最大で 4.1×10^2 cfu/gであったにも関わらず、加熱後のもも肉1検体から 2.8×10^3 cfu/gとより高値が検出されたことは、加熱工程を終えるまでの間に何らかの衛生管理が不十分であった可能性を示唆している。一方、スライス後及び製品の検体からは*E. coli*は検出されなかった。加えて著しく高い*E. coli*数を示した検体を含めて、加熱後以降の全検体でカンピロバクターは不検出であった。このことから、*E. coli*の高度汚染は必ずしもカンピロバクター汚染を伴っていることを意味しないと考えられる。これは福岡市が行った生食用鶏肉に関する調査で、 10^4 MPN/100g以上と高い値の推定大腸菌が検出された検体の半数以上がカンピロバクター陰性であったことから裏付けられる。但し*E. coli*汚染は食品衛生上好ましいものではなく、加熱ムラや加熱後の汚染などがないよう、衛生管理においてより

一層の配慮が必要である。

原料のもも肉における一般生菌数がむね肉より有意に高かったことは、もも肉は環境からの微生物汚染が高いことが示唆された。本研究で調査を行った加工場では、加熱の工程においてむね肉は湯通し90秒(湯温92℃)がなされるのに対し、もも肉には30秒の湯通し(同湯温)後に焼烙が行われており、湯通しと焼烙が併用されている。もも肉製品では全検体で 1.5×10^3 cfu/g以下、むね肉製品では 1.0×10^2 cfu/g以下となり、加熱により、もも肉・むね肉とも十分に汚染を抑えられていると考えられる。加えて、一般生菌数がむね肉製品でももも肉製品より有意に低い値であったことは、むね肉はとりわけ細菌汚染が軽度であることを示唆していると考えられる。

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

Bacteroides 属由来不活化菌体抽出物の投与は、鶏腸管内におけるカンピロバクター菌数の有意な低減効果があることが示された。今後、適用条件の最適化に加え、低減効果を示し得る物質の特定とその分子基盤の解明が必要な課題と考えられた。

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

食鳥処理場にはカンピロバクターを保菌しているロットが高頻度に搬入される。本研究の成績は、内臓摘出装置の適切な調整管理が腸内容物汚染低減を通じ、可食部への本菌汚染の低減につながることを示唆している。

過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウムをチラー工程に用いることは、現在汎用される薬剤に比べより高い汚染低減効果が得られる可能性が示唆された。また、チラー槽のpH調整も重要な影響因子であることが示された。

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

急速冷凍処理は冷蔵処理と同等のドリップ率を

示し、その応用は鶏肉中でのカンピロバクター汚染低減に資する一手法であると考えられた。

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

解体処理直後の加熱(湯通し、焼烙)工程の適用は鶏肉への糞便汚染除去に大きく寄与することが数的に示された。一方、通常処理を受けた鶏肉を原料として調理段階で表面を加熱することは流通保存を通じて当該菌の内部浸潤を招くため、十分な殺菌効果を有するとは言い難く、解体処理から加工工程までの一元的な衛生管理の推進が生食用鶏肉の安全な提供に資すると思われる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 著書

朝倉 宏. カンピロバクター食中毒. 公衆衛生.

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.* 96(4): 931-937.
- 2) Asakura H, Takahashi N, Yamamoto S, Maruyama H. Draft genome sequence of *Campylobacter jejuni* CAM970 and *C. coli* CAM962, associated with a large outbreak of foodborne illness in Fukuoka, Japan, in 2016. *Genome Announc.* 5(24): e00508-17.
- 3) Asakura H, Yamamoto S, Momose Y, Kato H, Iwaki M, Shibayama K. Genome Sequence of *Clostridium botulinum* strain Adk2012 associated with a foodborne botulinum case in Tottori, Japan, in 2012. *Genome Announc.* 5(34): e00872-17.

3. 学会発表

- 1) 朝倉宏、山本詩織、中山達哉、森田幸雄、中馬猛久．冷凍条件下における *Campylobacter jejuni* の遺伝子発現挙動 .第 91 回日本細菌学会学術総会 (福岡、2018 年 3 月)
- 2) 中村寛海、朝倉宏、山本香織、梅田薫、小笠原準．飲食店の調理環境におけるカンピロバクター汚染状況 .第 91 回日本細菌学会学術総会(福岡、2018 年 3 月)
- 3) 豊島裕樹、渡邊真弘、山本詩織、朝倉宏．過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウムによる、中抜きと鳥でのカンピロバクター汚染低減効果に関する検討 .第 44 回日本防菌防黴学会年次大会(大阪、2017 年 9 月)
- 4) 朝倉宏．食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染低減対策について．平成 29 年度食肉衛生技術研修会 .(東京、2018 年 1 月)
- 5) 森田幸雄．一般社団法人岩手県獣医師会主催，第 4 回食鳥肉安全性確保研修会 大規模食鳥処理場における微生物制御 (岩手、2017 年 9 月)
- 6) 森田幸雄 .日本成鶏処理流通協議会セミナー「カンピロバクター対策について」.(長野、2017 年 10 月)
- 7) 中馬猛久ら．認定小規模食鳥処理場で加工される生食用鶏肉の処理工程におけるカンピロバクター汚染菌数の評価 .第160回日本獣医学会(鹿児島、2017年9月)
- 8) 中馬猛久ら．認定小規模食鳥処理場の生食用鶏肉加工における焼烙のカンピロバクター汚染低減効果．第 38 回日本食品微生物学会 (徳島、2017年10月)
- 9) 中馬猛久ら．大規模食鳥処理場を通じて加工される生食用鶏肉のカンピロバクター汚染菌数の評価 .第 66 回九州地区日本獣医公衆衛生学会 .(沖縄、2017年10月)
- 10) 中馬猛久ら．食鳥肉における微生物汚染低減策の有効性実証事業の方向性．平成 29 年度鹿児島県獣医公衆衛生講習会(鹿児島、2017年10月)

- 11) 中馬猛久ら．生食用食鳥肉加工工程における細菌汚染実態調査．第10回日本カンピロバクター研究会総会 .(宮崎、2017年11月)
- 12) 朝倉宏、坂田淳子、田口眞澄、中村寛海、中山達哉、佐々木貴正、山本詩織、村上覚史．ヒト及び動物由来 *Campylobacter coli* 株の遺伝特性ならびに薬剤耐性．第10回日本カンピロバクター研究会総会 .(宮崎、2017年11月)

H. 知的財産権取得状況

該当なし

平成 29 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	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	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：昨年度、鶏盲腸便由来 *Bacteroides* 属菌体由来不活化抽出物が *Campylobacter jejuni* の生存・増殖に対して抑制作用を示すとの知見が得られたことを受け、本年度は、2 農場（A または B）で飼料切替時期 2 回に、飲水と共に当該成分を経口摂取させた場合の出荷時齢鶏腸管内におけるカンピロバクター菌数への影響を検討した。A 農場では非投与群が 1.46×10^9 CFU/g（平均）投与群平均が 1.16×10^7 CFU/g となり、約 2 対数個以上の減少が認められた。また、B 農場では非投与群平均が 1.15×10^6 CFU/g と A 農場に比べて少数の自然汚染を顕していたが、投与群では 8.40×10^3 CFU/g（平均）と A 農場と同様に 2 対数個/g 以上の低減を示した。以上の成績より、当該抽出物による鶏腸管内でのカンピロバクター保菌数の低減効果が示された。

A. 研究目的

鶏の生産段階におけるカンピロバクター汚染率は総じて高く、特に休薬期間を経た出荷時に急激な菌数の増加が生じるとされる。農場への導入時（幼雛期）には本菌が陰性であるが、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との報告もある。国内に流通する鶏肉の多くは50日齢程度のプ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由来の鶏肉の多くは高率に本

菌汚染を受けている。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、現在も解決されていない世界的課題であるが、一般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、種々の腸内菌叢の存在も見出されつつあり、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。

本分担研究では、出荷時齢のプロイラー鶏を対象として、昨年度までに見出されたカンピロバクターの生存増殖性に抑制効果を示した、鶏盲腸便由来 *Bacteroides* 属菌株の不活化菌体抽出物を 2 生産農場で投与し、腸管内容における本菌の定量的動態を比較解析したので報告する。

B. 研究方法

1) 検体

平成29年9月～11月の期間、九州地方にある A / B 農場の協力を得て、同農場で搬入後、飼養される肉用鶏の盲腸便を時系列を追って採材した。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量検出試験(次項)に供した。なお、投与群及び非投与群は同一農場敷地内に設置される異なる鶏舎で別個に、但し同時期に導入・飼育されるものとした。

2) *B. fragilis* 不活化抽出物の投与

BHIS broth で培養した *B. fragilis* an-51 株由来菌体破碎抽出物を凍結乾燥品として、上記農場に送付し、飼料切替時期(前期から後期飼料への切り替え、約 24 日齢; 後期から休葉飼料への切替時期、約 33 日齢)にそれぞれ飲水に添加した。同時に搬入・飼育される鶏群については陰性対照として設定した。

3) 定量検出試験

盲腸便検体 1g を速やかに 9 mL の滅菌リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4) に懸濁し、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・陰性の判定を行い、陽性集落数から検体 1g あたりの菌数を求めた。また、これと並行して、盲腸便検体懸濁液 1ml を 9mL 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後、PCR 法によるスクリーニング試験に供し、カンピロバクターの陽性・陰性判定を実施した。

C. 結果

1. 陽性・陰性農場の識別

2 農場 (A・B 農場) で *B. fragilis* 菌体由来不活化抽出物投与群及び非投与群を設定し、盲腸内容物 1g 中のカンピロバクター菌数を求めたところ、出荷時齢における同菌数は A 農場では非投与群が 1.46×10^9 CFU/ g (平均)、投与群が 1.16×10^7 CFU/ g となり、約 2 対数個以上の減少

が認められた。また、B農場では非投与群が 1.15×10^6 CFU/gとA農場に比べて少数の自然汚染を顕していたが、投与群では 8.40×10^3 CFU/gとA農場での成績と同様に2対数個/g以上の低減を示した。

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、昨年度の成果を受け、*Bacteroides*属由来生理活性物質がカンピロバクター定着に示し得る生物学的役割を検討した。対象2農場において、投与群は非投与群に比べて有意な菌数低減を示したことは、その普遍性と今後の応用性が期待されると考えられる。一方で、その投与方法として今回実施した内容が最適であるかどうかは定かではなく、今後適用方法を含めた改良評価が実用化には必要不可欠な課題と考える。

E. 結論

*Bacteroides*属由来不活化菌体抽出物の投与は、鶏腸管内におけるカンピロバクター菌数の有意な低減効果があることが示された。今後、適用条件の最適化に加え、低減効果を示し得る物質の特定とその分子基盤の解明が必要な課題と考えられた。

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

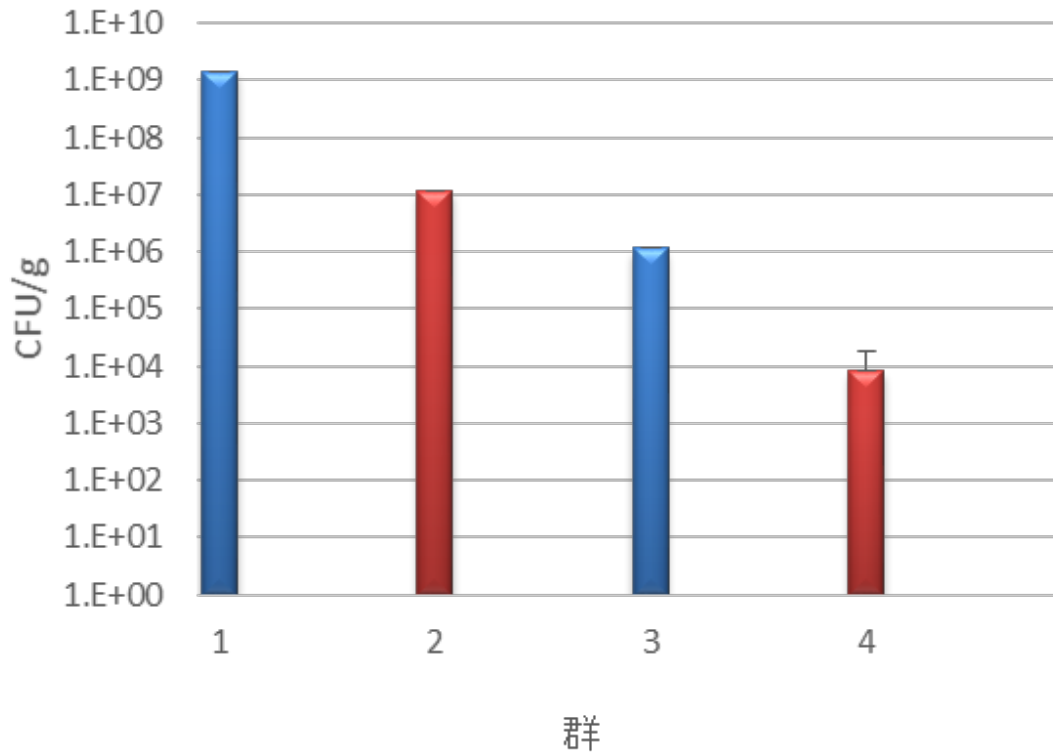


図1 . *Bacteroides* 属菌由来不活化抽出物投与による、出荷時齢鶏盲腸便におけるカンピロバクター菌数への影響 .

1 : A 農場・非投与群 (対照群) 2 : A 農場・投与群、 3 : B 農場・非投与群 (対照群) 4 : B 農場・投与群 .

平成 29 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)
分担研究報告書

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:中抜き機による内臓破損がと体表面の衛生に及ぼす影響

研究協力者 盆下誌保	東京家政大学
宇都菜央, 尾崎正秀, 島原道範	株式会社大山どり
藤田雅弘	群馬県衛生環境研究所
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

食鳥処理場へ搬入されるロットのカンピロバクター, サルモネラの保菌状況, 内臓摘出処理時のと体へ汚染の実態および汚染とと体表面の細菌数について調査を実施した。食鳥処理場にはカンピロバクターを保菌しているロットが多く搬入されていた。適切に調整した内臓摘出装置で処理した場合はと体への腸内容物の汚染を0%に近づけることができた。内臓摘出装置で「肛門抜き」の工程で腸内容物の汚染が多い時は, その後の処理工程においても汚染が多いことが判明した。内臓摘出装置を適切に調整, メンテナンスすることで, と体表面へのカンピロバクターの付着の減少, 大腸菌, 大腸菌群, 一般生菌数を減少させ, 衛生的な鶏肉を生産できる可能性があると思われた。

A. 研究目的

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。カンピロバクターは鶏の腸管内に生息していることから, 食鳥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。

本年は鶏の内臓摘出処理時のと体へ汚染の実態および汚染とと体表面の細菌数について調査を実施した。

B. 研究方法

1. 食鳥処理場に搬入される鶏の盲腸中のカンピロバクター・サルモネラの検出状況

大規模食鳥処理場を訪問し 6 つの搬入ロット(午前中1ロット, 午後1ロット, 計 3 日間)の盲腸

内容を 1 ロットあたり 5 検体ずつ採取し, カンピロバクターとサルモネラの検査を実施した。

カンピロバクターの定性検査方法: 盲腸内容 10g を 100mL のプレストン培地に接種し, 42 °C 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 °C 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た。

サルモネラの定性検査方法: 盲腸内容 10g を 100mL の RV 培地(Oxoid)に接種し, 42 °C 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 °C で 24 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

た。

2. 処理ロットにおける各処理工程ごとの腸内容物汚染や腸の破損の発生率と細菌検出状況

大規模食鳥処理場を訪問し 6 つの搬入ロット(午前中1ロット, 午後1ロット, 計3日間)について処理工程の「肛門抜き」「肛門前腹部の切開」「内臓摘出後」の400体以上のと体について, 腸内容物の汚染や腸の破損の有無を観察した(写真1, 2, 3)。

各ロットのチラー前の中抜きと体のモモ部(5cm×5cm)をふき取り綿棒(BMフキトレールA: 関東化学)でふき取った。そのふき取り検体を持ちてカンピロバクターおよびサルモネラの定性検査を試みた。カンピロバクターおよびサルモネラの定性検査は前述のとおりである。大腸菌数, 大腸菌群数, 一般生菌数の測定についてはペトリフィルム(3M)を用いた。

菌数の平均は対数平均を実施, 有意差の検定はt検定を実施し, 5%未満の危険率の場合を有意差ありとした。

C. 研究結果

1. 食鳥処理場に搬入される鶏の盲腸中のカンピロバクター・サルモネラの検出状況

6つの搬入ロット(A~F)の盲腸内容の30検体を検査したところ検査した全てのロットからカンピロバクターが検出された。ロットA, C, Fは5検体中5検体から, ロットBとEは5検体中4検体から, ロットDは5検体中1検体からカンピロバクターが検出された。いっぽう, サルモネラは全ロットから検出することは無かった(表1)。

2. 処理ロットにおける各処理工程ごとの腸内容物汚染や腸の破損の発生率と細菌検出状況(図1)

処理ロットによって腸内容物の汚染や腸の破損の発生率は大きく異なっていた(図1)。「肛門抜き」の工程では最大17%から最少1%の腸内容物の汚染, 「肛門前腹部の切開」における腸の破

損は最大30%から最少1%の腸内容物の汚染, 「内臓摘出後」のと体への腸内容物の汚染では最大44%から最少0.5%の腸内容物の汚染が認められた。また, これらの汚染や破損はすべて同じ傾向があり, ロットAが一番多く, ロットFが一番少なかった。

チラー前の中抜きと体のモモ部からはロットBは5検体中4検体から, ロットCは5検体中3検体から, ロットAとEは5検体中1検体からカンピロバクターが検出された。ロットDとFからはカンピロバクターは検出できなかった。サルモネラは全てのロットから検出しなかった。

内臓摘出後のと体の腸内容物汚染の割合別(10%を超えるロットと10%以下のロット)にみたとき取りによる大腸菌, 大腸菌群, 一般生菌数について表2に示す。10%を超えるロットの平均大腸菌数, 大腸菌群数, 一般生菌数は7.6個/ml, 8.1個/ml, 392.2個/ml, 10%以下のロットの平均大腸菌数, 大腸菌群数, 一般生菌数は1.6個/ml, 1.9個/ml, 118.3個/mlであった。t検定により有意差($p < 0.05$)は認められないものの10%を超えるロットに比べて, 10%以下のロットの大腸菌, 大腸菌群, 一般生菌数は低値を示した。

D. 考察

1. 食鳥処理場に搬入される鶏の盲腸中のカンピロバクター・サルモネラの検出状況

本大規模食鳥処理場に搬入された6つのロットはカンピロバクターを保菌, サルモネラは保菌していなかった。養鶏場においてカンピロバクターは高度に汚染, サルモネラの汚染は減少しているものと推測された。1ロットについて5検体を検査した本調査においても, 5検体全てから検出されるわけではなく, ロットの中にもカンピロバクターを保菌している個体, 保菌していない個体があることが再確認された。

2. 処理ロットにおける各処理工程ごとの腸内容物汚染や腸の破損の発生率と細菌検出状況

内臓摘出装置の調整や定期的なメンテナンスによって食鳥の処理工程の腸内容物の汚染や腸の破損の発生率は大きく変化することが判明した。また、「肛門抜き」の工程で腸内容物の汚染が多いものは、その後の、「肛門前腹部の切開」における腸の破損、「内臓摘出後」と体への腸内容物の汚染においても発生率は高いことが判明した。

ロット D と F のモモ肉のふき取りからはカンピロバクターは検出できなかった。ロット D は内臓摘出後のと体の腸内容物汚染 10%、盲腸内容物は 5 検体 1 検体からカンピロバクターが検出、ロット F は内臓摘出後のと体の腸内容物汚染 0.5%、盲腸内容物は 5 検体 5 検体からカンピロバクターが検出されている。これらのことから、腸内容物汚染率または盲腸内容物の検出率が低ければ、モモ肉のカンピロバクターの検出は減少する可能性があると思われた。

内臓摘出後のと体の腸内容物汚染率が 10%を超えるロットに比べて 10%以下のロットの大腸菌、大腸菌群、一般生菌数は t 検定により有意差($p < 0.05$)は認められないものの低値を示した。と体の腸内容物汚染率を減少させることは、と体表面の大腸菌、大腸菌群、一般生菌数を減少させる可能性が高いことが示唆された。

日々の内臓摘出装置の調整し、定期的なメンテナンスにより、内臓摘出工程における腸内容物の汚染を減少させ 0%に近づけることは、と体表面へのカンピロバクターの付着の減少、大腸菌、大腸菌群、一般生菌数を減少させ、衛生的な鶏肉を生産できる可能性があると思われた。

E. 結論

食鳥処理場にはカンピロバクターを保菌しているロットが搬入されている。内臓摘出装置を適切に調整、メンテナンスすることで、腸内容物の汚染を 0%に近づける可能性があること。なお、内臓摘出装置で「肛門抜き」の工程で腸内容物の

汚染が多い時は、その後の処理工程においても汚染が多いことが判明した。内臓摘出装置を調整し、内臓摘出工程における腸内容物の汚染を減少させることは、と体表面へのカンピロバクターの付着の減少、大腸菌、大腸菌群、一般生菌数を減少させ、衛生的な鶏肉を生産できる可能性があると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表等

なし

2.学会等発表

森田幸雄，一般社団法人岩手県獣医師会主催，第 4 回食鳥肉安全性確保研修会 大規模食鳥処理場における微生物制御，八幡平ハイッ，岩手県平成 29 年 9 月 7-8 日

森田幸雄，日本成鶏処理流通協議会主催，全国協議会セミナー「カンピロバクター対策について」，ホテルマロウド軽井沢，長野県北佐久郡，平成 29 年 10 月 20 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

写真1. 肛門抜き時の腸内容物汚染例



写真2. 肛門前腹部の切開時の腸の破損例

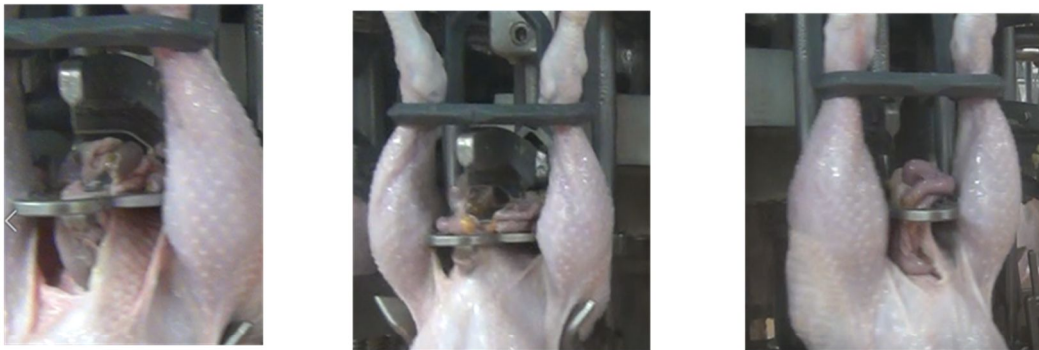


写真3. 内臓摘出後の腸内容物汚染例



表1 盲腸内容物中のカンピロバクター・サルモネラの検出状況

処 理 ロット	カンピロバクター	サルモネラ
A	5/5	0/5
B	4/5	0/5
C	5/5	0/5
D	1/5	0/5
E	4/5	0/5
F	5/5	0/5
平均	24/30	0/30

表2 内臓摘出後のと体の腸内容物汚染の割合別にみたとふき取りによる大腸菌、大腸菌群、一般生菌数

調査菌	内臓摘出後の 腸内容物汚染 の割合	処 理 ロット	モモ部のふき取り (個/ml)	
大腸菌	> 10%	A	6.4	
		B	4.3	
		C	16.0	
		対数平均	7.6	
	10% ≧	D	1.9	
		E	1.2	
		F	1.8	
		対数平均	1.6	
	対数平均			3.5
	大腸菌群	> 10%	A	8.1
B			4.3	
C			15.2	
対数平均			8.1	
10% ≧		D	1.9	
		E	1.9	
		F	2.0	
		対数平均	1.9	
対数平均			4.0	
一般生菌		> 10%	A	842.4
	B		237.0	
	C		302.2	
	対数平均		392.2	
	10% ≧	D	150.8	
		E	95.0	
		F	115.6	
		対数平均	118.3	
	対数平均			215.4

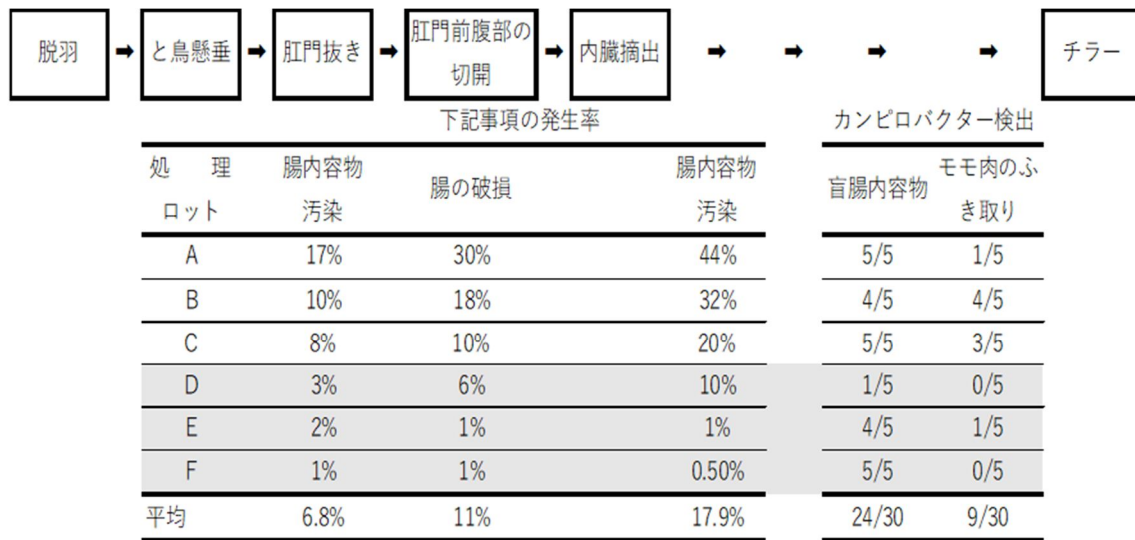


図1 処理ロットにおける各処理工程ごとの腸内容物や腸の破損の発生率とカンピロバクター検出状況

「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

酸化剤系殺菌剤の添加による中抜きと鳥のカンピロバクター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	渡辺真弘	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：食品添加物として平成 28 年 10 月より食鳥肉表面の殺菌に使用可能となった、過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた中抜きと鳥の浸漬処理は次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた場合よりも有意にカンピロバクター汚染菌数を低減させることを定量的に示した。

A. 研究目的

平成28年10月に過酢酸製剤や亜塩素酸ナトリウム等を食鳥肉へ食品添加物として使用することが認められた。これを受け、本分担研究では中抜きと鳥を用いてカンピロバクター・ジェジュニの添加回収試験を行い、過酢酸製剤ならびに亜塩素酸ナトリウム溶液を食鳥処理工程の冷却水に適用した場合の本菌殺菌効果に関する定量的知見を得ることを目的として検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 殺菌料の調整：過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウムの調整は使用 10 分前に行った。特に亜塩素酸ナトリウムについては殺菌性を高める為、1.428g/4mL の原

液に、10mL の 1M クエン酸を添加後、10L 容の水道水に加え、十分に攪拌させ、温度及び pH 値を確認しつつ調整した。比較対照及びブランクとしては、次亜塩素酸ナトリウム溶液及び水道水を用いた。2) 中抜きと鳥を用いた添加回収試験：カナマイシン耐性を示す *C. jejuni* 株を約 3 kg 重量の中抜きと鳥表面に接種し 4 で 20 分間静置した。各殺菌剤を含む浸漬液中で 30 分間処理した後、検体を大気中で 5 分間静置し、残留殺菌剤の蒸散を促した。その後、PBS200 mL と共に、ストマッカー袋に加え、1 分間十分に手揉みして表面洗浄液を得た。同液に終濃度 0.1% のチオ硫酸 Na 溶液を加え、遠心分離 (2,160 x g、20 分間) を行った。その後、得られた沈渣を 2.5 mL の PBS で再懸濁し、mCCDA 寒天培地および標準

寒天培地、VRBG 寒天培地に塗布し、各条件にあわせて培養を行うことで、被験株及び衛生指標菌（生菌数、腸内細菌科菌群数）の生存性を評価した（図1）。

C. 結果

1. 陽性・陰性農場の識別

添加回収試験を通じた中抜きと鳥におけるカンピロバクター汚染に対する各種殺菌剤の低減効果は、100ppmの次亜塩素酸ナトリウム浸漬で、2.08 logCFU/羽の減少、水道水処理では1.03 logCFU/羽の減少であったのに対し、50ppm及び100ppmの過酢酸製剤はそれぞれ2.69 logCFU/羽及び3.29 logCFU/羽の減少を示した。50ppm過酢酸製剤処理による中抜きと鳥検体の外観変化は認められなかった。過酢酸製剤処理液のpH範囲は、25ppmでpH4.6、50ppmでpH4.3、100ppmでpH4.0、200ppmでpH3.8であった。

一方、亜塩素酸ナトリウム溶液（いずれもpH2.5、10、50、150ppm）を用いた30分間の浸漬により、全ての濃度で被験菌株は回収されず、4.75logCFU/羽以上の低減効果があることが示された。濃度非依存性の汚染低減効果から、次に酸性化によるものと想定し、複数段階のpHから成るPBS溶液中での本菌生存性を評価したところ、pH4.0以下の条件で有意な減少を示すことが明らかとなった。

D. 考察

過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウム溶液による浸漬は、中抜きと鳥におけるカンピ

ロバクター汚染菌数の低減に有効であることを示す成績が得られた。その低減効果の大きさは次亜塩素酸ナトリウム溶液等と比べて大きかったことから、中抜き後のチラー槽へ添加する殺菌剤については各施設の状況に応じて検討する余地があると思われる。

また、両薬剤は共に酸化剤としての性質を有しており、本研究の成績は、pHを酸性側（pH4.0未満）に傾けることのみによってもカンピロバクター汚染菌数を一定の割合で低減させる効果が得られることを示唆していると思われる。過酢酸製剤には酢酸等が含まれているほか、亜塩素酸ナトリウム溶液の調整にはクエン酸等が用いられていることから、こうした有機酸の応用はより実用性に富むものとなるかもしれない。

一方で、本研究で用いた両薬剤は共に複合的な殺菌効果を示し得る構成となっている。後者は混合時に有毒ガスを生じる可能性が指摘されており、食鳥処理施設等での使用を考える上では、自動混合注入装置の導入が最適と思われるが、ペットボトル等を用いた手動の混合法も有効と思われる。

E. 結論

過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウムをチラー工程に用いることは、現在汎用される薬剤に比べより高い汚染低減効果が得られる可能性が示唆された。また、チラー槽のpH調整も重要な影響因子であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- ・豊島裕樹、渡邊真弘、山本詩織、朝倉宏．過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウムによる、中抜きと鳥でのカンピロバクター汚染低減効果に関する検討．第44回日本防菌防黴学会年次大会(大阪、2017年9月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

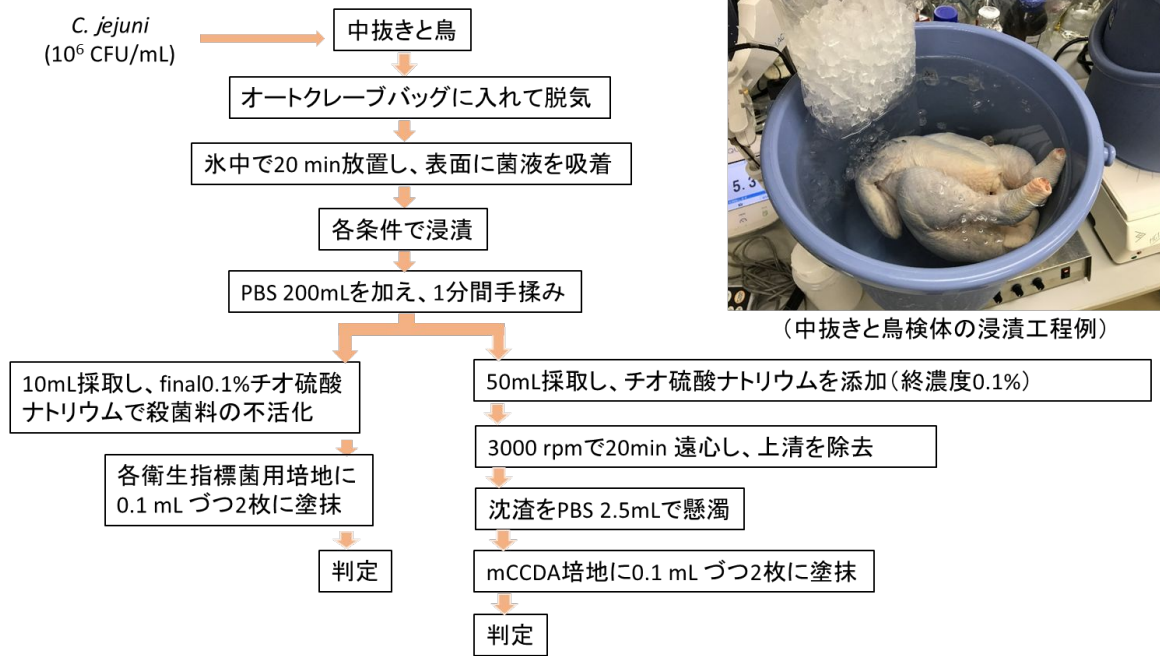


図1 中抜きと鳥表面への各種処理フロー

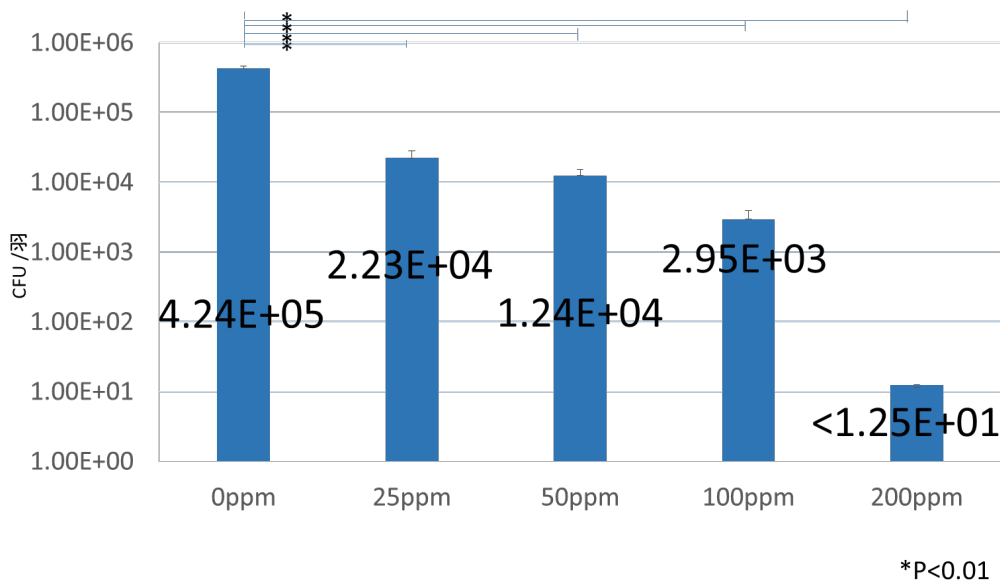


図2. 処理濃度の別による、過酢酸製剤添加に伴う、中抜きと鳥でのカンピロバクター汚染低減挙動. 浸漬条件は4、30分間とした。

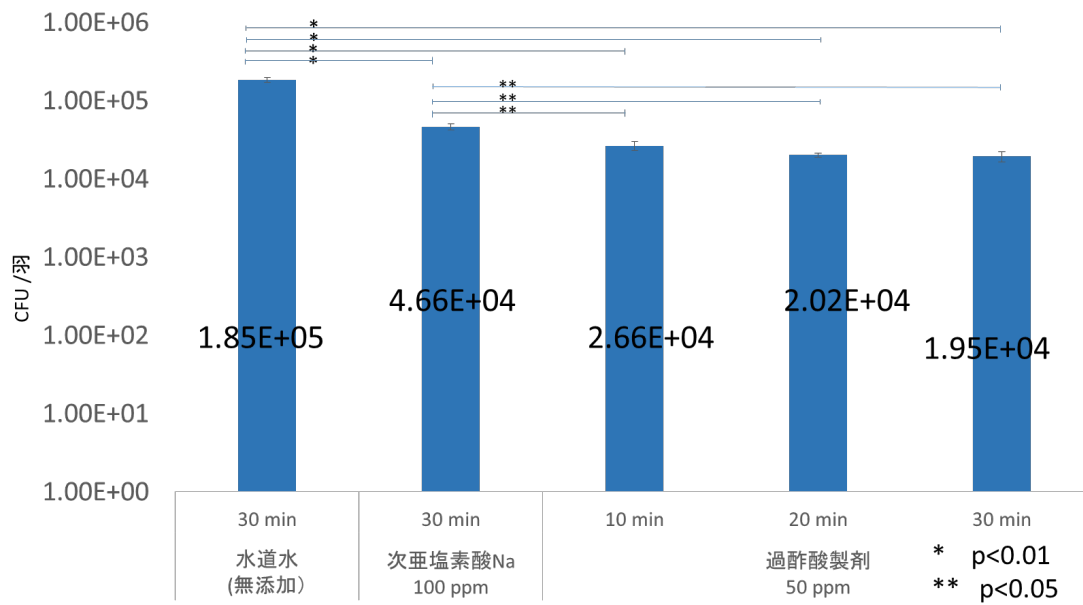


図 3. 処理時間の別による、過酢酸製剤及び次亜塩素酸ナトリウム添加に伴う、中抜きと鳥でのカンピロバクター汚染低減挙動。浸漬温度は全て 4℃とした。

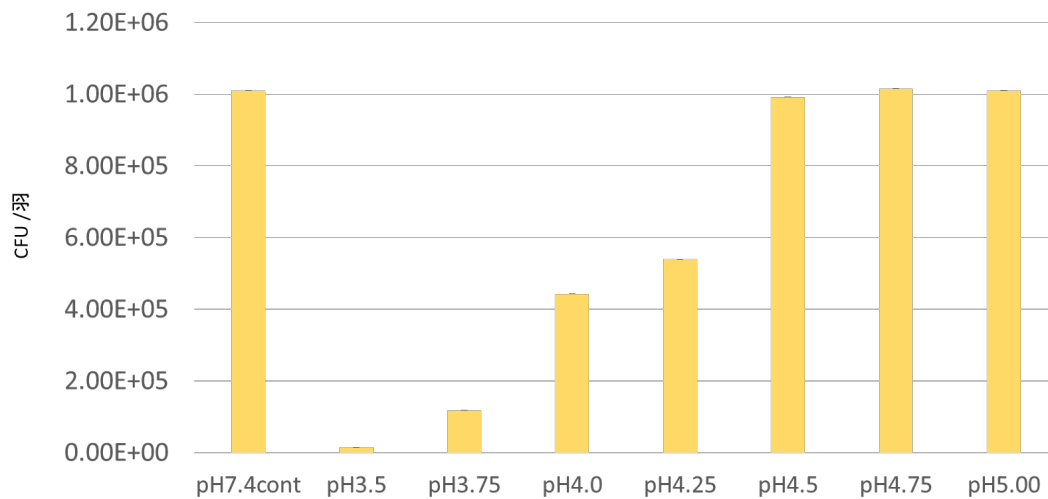


図 4. 異なる pH の水道水での浸漬に伴う、中抜きと鳥でのカンピロバクター汚染低減挙動。浸漬条件は全て 4℃・30 分間とした。

表 1. 過酢酸製剤及び亜塩素酸ナトリウムを用いた 30 分間の浸漬処理に伴う、中抜きと鳥におけるカンピロバクター数、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数及び大腸菌数の挙動。

処理群	カンピロバクター 添加回収成績				一般細菌数		腸内細菌科 菌群		大腸菌群		<i>E.coli</i>	
	添加菌数	回収菌数	減少菌数	殺菌数	検出数	減少菌数	検出数	減少菌数	検出数	減少菌数	検出数	減少菌数
水道水	6.64	5.62	1.03	0.00	6.54	0.00	5.85	0.00	5.94	0.00	5.90	0.00
過酢酸製剤25ppm	6.45	4.28	2.17	1.34	6.00	0.54	5.41	0.44	5.43	0.51	<4.12	>1.78
過酢酸製剤50ppm	6.66	3.97	2.69	1.65	5.74	0.80	4.70	1.16	4.81	1.13	4.83	1.07
過酢酸製剤100ppm	6.56	3.27	3.29	2.35	5.41	1.13	<4.02	>1.83	<4.18	>1.76	<4.07	>1.83
過酢酸製剤200ppm	6.45	<1.70	>4.75	>3.92	3.97	2.57	<3.00	>2.85	<3.00	>2.94	<3.00	>2.90
pH2.5調整水道水 (クエン酸添加)	6.78	<1.70	>5.08	>3.12	5.83	0.80	<3.29	>2.54	4.31	1.72	3.74	2.21
NaClO ₂ 10ppm pH2.5	6.86	<1.70	>5.16	>3.12	5.75	0.88	<3.27	>2.56	4.28	1.74	<3.31	>2.64
NaClO ₂ 50ppm pH2.5	6.66	<1.70	>4.96	>3.12	5.65	0.98	<3.12	>2.71	<3.68	>2.35	<3.00	>2.95
NaClO ₂ 150ppm pH2.5	6.45	<1.70	>4.75	>3.12	5.55	1.08	<3.08	>2.75	3.54	2.48	<3.00	>2.95

平成29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

冷凍処理に伴う鶏肉の物性変化に関する研究

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	牧野有希	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：

これまでに本研究班の分担研究では海外の鶏肉におけるカンピロバクター汚染危害の低減に向けた施策にも用いられている冷凍処理に着目し、その低減効果を定量的に検討することで、確実な低減効果をもたらすことを示してきた。一方で、当該処理に伴う食鳥肉の品質への影響については未検討であったことから、本年度は物性試験（ドリップ率、遠心遊離水分率、破断応力）により評価した。鶏ムネ肉検体を対象とした検討を通じ、空冷式の緩慢冷凍処理ではドリップ率が高まる傾向にあったが、急速冷凍処理は冷蔵と同等のドリップ液漏出を示すことが見出され、後者の活用は本菌汚染低減と品質保持の両面から利点となりうるものと考えられた。

A. 研究目的

コーデックス委員会が定めた食鳥肉の衛生対策ガイドライン（CAC/GL 78-2011）では、冷凍処理が加工流通段階における食鳥肉中のカンピロバクター汚染低減効果を有する一手法として挙げられており、実際にアイスランド、ニュージーランド、デンマークでは、法的拘束力を有する手法としても採用されている。本研究ではこれまでに冷凍処理が我が国で生産される鶏肉中のカンピロバクター汚染低減に有効であることを定量的に示してきた。実際に、我が国

が輸入する鶏肉は概して冷凍処理が施されており、国産の冷蔵流通される鶏肉に比べて本菌汚染率が低いとする報告もある。しかしながら、輸入冷凍鶏肉の多くはドリップ率が高い等の声もあり、品質面で課題があるとの指摘もある。こうしたことから本分担研究では、冷凍処理として急速冷凍処理及び空冷式の冷凍庫を用いた緩慢冷凍処理を対象に物性試験を行い、処理後の物性変化について冷蔵鶏肉との比較を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 鶏肉検体及び冷凍処理

朝挽きの国産鶏ムネ肉(約 400g 重量/検体、大きさの平均は 14.2cm x 13.2 cm x 2.8 cm) を入手し、1 時間以内に冷蔵温度帯で当所へ搬入し、速やかに冷凍・冷蔵処理に供した。冷凍処理については、一昨年度の報告に示した急速冷凍処理(-30 のエタノールをベースとする溶液に浸漬させる方法)、緩慢冷凍処理(-20 を設定温度とする空冷式の家庭用冷凍庫を用いた) 並びにチルド(4 保存)の 3 群に分けた(各群につき N=3)。各群とも 3 時間の処理を行い、冷凍処理 2 群については-20 で、冷蔵処理群については 4 のまま、それぞれ約 20 時間更に保存後、物性試験に供した。その後、4 で 20 時間の自然解凍を行い、以下の物性試験に供した。

2) 物性試験

鶏肉の物性試験項目として、ドリップ率、遠心遊離水分率及び破断応力を用いた。それぞれの試験については、ドリップ率：解凍保存中に漏出するドリップをとらえること、遠心遊離水分率：肉塊中のドリップをとらえること、破断強度：いわゆる噛みごたえを検討すること、をそれぞれ目的として、日本家畜改良センターが作成した「食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル」に準じて検討した。

C. 結果

平均 400 g 重量の鶏ムネ肉検体について 3 時間急速冷凍処理した後、-20 度の緩慢冷凍(空冷式)処理を行った検体の自然解凍後のドリップ率は 0.96% となり、冷蔵処理群と同等の数値を示した(0.93%)。一方で、緩慢冷凍処理群のドリップ率は 2.97% と他二群に比べて有意に高値を示した(図 1A)。破断応力及び遠心遊離水分

率については、各群間で統計学的に有意差は認められなかった(図 1BC)。

D. 考察

本研究では、急速冷凍・緩慢冷凍処理に伴う鶏むね肉の物性変化に関する比較を行った。急速冷凍処理によるカンピロバクターの汚染低減効果は緩慢冷凍と同様であったものの、物性変化として急速冷凍は緩慢冷凍に比べ、冷蔵処理と同等のドリップ発生を抑える利点が示されたことから、今後の利活用が期待される。カンピロバクターは大腸菌やサルモネラ属菌等に比べると、冷凍処理に極めて弱く、汚染低減効果は明確に表れる。一方、菌株間では抵抗性に差異も認められているため、今後はこうした形質の差異を裏付ける分子基盤の特定を行い、その基盤の破綻を助長する手法の開発等へつなげることができれば、より大きな低減効果を有する手法の策定へとつながることも期待されよう。

E. 結論

急速冷凍処理は冷蔵処理と同等のドリップ率を示し、その応用は鶏肉中でのカンピロバクター汚染低減に資する一手法であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

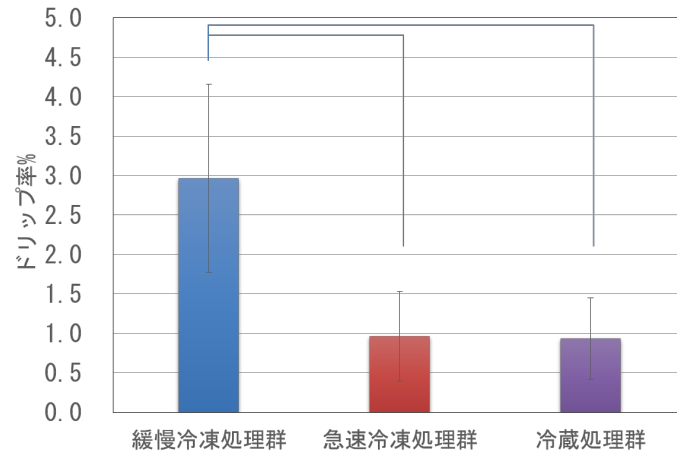
2. 学会発表

・朝倉宏、山本詩織、中山達哉、森田幸雄、中馬猛久、冷凍条件下における *Campylobacter jejuni* の遺伝子発現挙動、第 91 回日本細菌学会学術総会(福岡、2018 年 3 月)

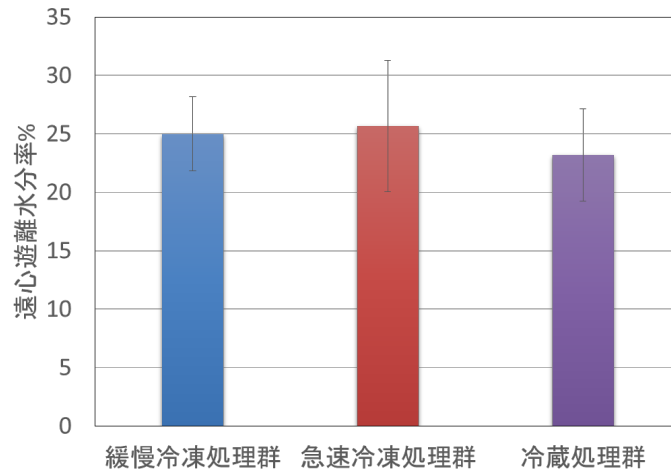
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A



B



C

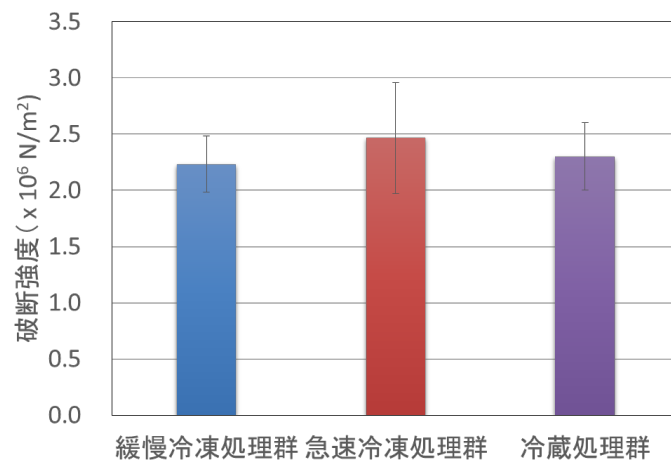


図1. 冷凍・冷蔵処理を通じた鶏ムネ検体の物性変化.

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

鹿児島県や宮崎県では鶏肉の表面をタキにしたいわゆる「鶏刺し」を食べる文化が根付いており、日常的に食されているにもかかわらず、鹿児島県での鶏刺しによる食中毒の報告は流通量の多さに対して極めて少ない。平成28年度までの我々の研究において、鹿児島県の市販鶏刺しは加熱用鶏肉よりも著しくカンピロバクター汚染が抑えられていることが示された。そこで本研究では、鹿児島県における鶏刺し加工で施される湯通しや焼烙といった表面加熱によるカンピロバクター汚染低減効果を検討することを目的とした。認定小規模食鳥処理場または大規模食鳥処理場で解体・加工される生食用鶏肉のカンピロバクター汚染状況を工程ごとに調査した。

調査1では認定小規模食鳥処理場で解体・加工された食鳥について、工程(脱羽後、チラー後、焼烙後)ごとに得たと体表面ふき取り材料を検査した。と体表面のカンピロバクターは一部の脱羽後検体から少量検出されたが、チラー後以降の検体からは全く検出されなかった。*E. coli* (大腸菌数)やTC(大腸菌群数)は焼烙後に全て陰性となり、TVC(一般生菌数)も全ての検体で焼烙後に6 cfu/g以下となったことから、焼烙が糞便汚染の除去に大きく寄与していることが示唆された。

調査2では大規模食鳥処理場で解体され加工場へ搬入された生食用鶏肉を材料とし、同様に検査した。もも肉の原料から6検体平均 8.1×10 MPN/10gのカンピロバクターが検出されたものの、加熱後以降は陰性であった。また、むね肉の加熱後以降ではカンピロバクター、*E. coli*ともすべて陰性であった。これらの結果から、表面加熱が十分に効果を示していることが示唆された。

以上より、カンピロバクターの汚染制御の手段として表面加熱が効果的であり、一連の加工工程の中で適切な取り扱いを徹底することにより生食用鶏肉を安全に提供することが可能であると考えられた。

A. 研究目的

鹿児島県や宮崎県では、鶏肉(主にもも肉やむね肉)を湯通しするか、あるいは表面を炙るなどして、タキにして食する文化が根付いている。これがいわゆる「鶏刺し」や「鶏たたき」などといった名称で両県のスーパー等の小売店に日常的に並び、広く親しまれている。同地域で加工される鶏刺しは主に廃用となった種鶏(ブロイラー

の生産に用いられた繁殖目的の肉用種であり、飼育日数がおよそ450日前後)を原料としており、日本各地から加工場へ集められている。現在、日本の様々な地域において飲食店などで鶏刺しが提供されており、鶏刺しを食べる機会は南九州地域に限らず日本各地に広がっている。

鹿児島県や宮崎県では、それぞれ「生食用食鳥肉の衛生基準」、「生食用食鳥肉の衛生対策」

が独自に策定され、関連業者に周知されている。両県では流通量の多さに対して鶏刺しによる食中毒の報告は極めて少なく、衛生管理の行き届いている業者が多いものと考えられる。

我々は平成28年度までの研究で、鹿児島県で市販されている生食用鶏肉(鶏刺し)と加熱用鶏肉のカンピロバクター汚染菌数について調査を行った。その結果、生食用鶏肉では加熱用鶏肉と比較して汚染が著しく低い傾向がみられ、鹿児島県で加工される鶏刺しは概ねカンピロバクターによる汚染が制御されていることが示唆された。しかしながら、鶏刺しの加工工程においてカンピロバクターの汚染低減につながる施策についてのデータは未だない。

そこで本年度は、鶏刺し加工において施される表面の加熱(湯通し、焼烙)がカンピロバクター汚染低減に与える効果について検討することを目的とした。認定小規模食鳥処理場(年間処理羽数 30 万羽以下)で食鳥を解体および加工する業者と大規模食鳥処理場(年間処理羽数 30 万羽超)で解体された食鳥を加工する業者の 2 つの加工形態について検討した。前者は調査1、後者は調査2として述べる。

調査1

認定小規模食鳥処理場の処理工程におけるカンピロバクター汚染菌数の評価

B. 研究方法

1. 材料の採取

鹿児島県内の認定小規模食鳥処理場 1 か所にて生食用として解体および加工された食鳥について、1度に6羽を対象として5度の採材を実施し、計 30 羽より材料を得た。採材時期は、2016年8月(1回目、2回目)、9月(3回目)、11月(4回目)、2017年2月(5回目)である。採材を行った処理場の工程表を図1に示した。搬入前の生体から、滅菌綿棒を用いて総排泄腔よりスワブ(直腸スワブ)を採取した。さらに、脱羽後、

チラー後、焼烙後のと体表面 25 cm²(5 cm×5 cm)をワイブチェック(SATO KASEI KOGYOSHO, Co., Ltd.)により拭き取った。

5度の採材の中で、前半2度と後半3度はそれぞれ異なる食鳥処理の条件下で行った。1度目、2度目の採材の際はチラー水を取り替えたばかりの真新しい状態で処理を行い、3度目~5度目の採材は70羽~80羽ほど既に処理した後のチラー水を使用した処理中に実施した。いずれもチラー水調製時の次亜塩素酸ナトリウム濃度は100 ppmであった。

2. カンピロバクターの分離・同定および MPN 法によるカンピロバクター数の推定

採取した直腸スワブについて、カンピロバクターの存在の有無を調べるため、プレストン液体培地 10 ml に接種し培養後、バツラー培地(Oxoid, Ltd.)に画線塗布した。

と体表面ふき取り材料については、MPN 3 本法によりカンピロバクター数の推定を行った。ワイブチェック原液から、滅菌生理食塩水を溶媒として10倍、100倍希釈液を調製した。この3段階の溶液を1検体当たり各濃度3本ずつ、計9本のプレストン液体培地 10 ml に接種した。培養後、バツラー寒天培地に画線塗布した。

直腸スワブ、ふき取り材料のいずれも、バツラー寒天培地上のカンピロバクター様コロニーについて、位相差顕微鏡を用いてらせん状桿菌の存在を確認した上で Mueller-Hinton (MH) 寒天培地(Oxoid, Ltd.)に画線塗布し、純培養した。この一連の菌分離にあたって、培養はすべて微好気条件下、42、48 時間で実施した。種の同定にはダイレクトコロニーPCRを用いた。

3. Polymerase chain reaction (PCR)によるカンピロバクターの種同定

*C. jejuni*の特異的プライマーとしてVS15、VS16を用い、*C. coli*の特異的プライマーとしてCC18F、

CC519R を用いた。これら 4 種のプライマー(いずれも 2 pmol/μl) をそれぞれ 2 μl ずつ、EmeraldAmp PCR Master Mix (TAKARA BIO, INC.) 10 μl、滅菌蒸留水 2 μl、合わせて 20 μl を 1 検体あたりの反応液とし、これに 1 白金線量のコロニーを加えた。陽性コントロールとして、過去に同定済みの *C. jejuni* 株、*C. coli* 株からそれぞれ抽出した DNA を用いた。PCR は、94 1 分、94 20 秒(*)、56 30 秒(*)、72 30 秒(*)、72 1 分の反応条件(*を 30 サイクル)で実施した。PCR 反応後、1.5 %アガロースゲル(Agarose I, amresco)で 100 V、60 分電気泳動を行い、増幅サイズを肉眼で確認した。

4. *E. coli* 数、大腸菌群数、一般生菌数の算定

E. coli 数および大腸菌群数算定にペトリフィルム EC プレート(3M)、一般生菌数算定にペトリフィルム AC プレート(3M)を用いた。各プレートにワイブチェック原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液それぞれ 1 ml を接種した。好気条件において 37 °C で 24 時間培養後、指示書に基づきコロニーの数を算定した。指示書の適正測定範囲に従い、菌数を導いた。

C. 研究結果

1. 各工程から検出された *E. coli* 数、大腸菌群数、一般生菌数、カンピロバクター数の推移

検体 No. 1~12 の解体の際には、次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm に調製された直後のチラー水が用いられた。検体 No. 13~30 の解体の際には、すでに 70 羽程度の食鳥を処理した後のチラー水が用いられた。食鳥処理の各工程において、これら 30 羽から検出された *E. coli* 数、大腸菌群数、一般生菌数、カンピロバクター数をそれぞれ図 2-A、B、C、D に示した。

脱羽後のと体から最大で 100 cfu/25cm² の *E.*

coli が検出された。しかしながら、そのと体を含むすべての検体でチラー後には 7 cfu/25cm² 以下まで減少し、加熱(焼烙)後には全く検出されなかった。

大腸菌群も同様に、脱羽後と比較してチラー後にはすべての検体で菌数の減少が認められ、平均として 46.3 cfu/25cm² から 6.5 cfu/25cm² へ菌数を減らした。また、*E. coli* と同じく加熱(焼烙)後には全く検出されなかった。

一般生菌数は、脱羽後に最も大きな値を示したと体で 2.1×10^2 cfu/25cm² 検出された。脱羽後からチラー後までの間に、菌数の上昇が認められた検体は存在しなかった。一方、脱羽後に最大値を示したと体を含む 6 検体で加熱(焼烙)後に一般生菌は検出されず、平均 1.0 cfu/25cm² まで抑えられた。

No. 1~6 および No. 7~12 の 2 鶏群 12 羽すべての直腸スワブからカンピロバクターが検出された(*C. jejuni* 10 検体、*C. coli* 2 検体)。と体ふき取り材料からは、脱羽後の 12 検体中 5 検体でカンピロバクターが分離された(すべて *C. jejuni*) 一方、チラー後および焼烙後の検体ではすべてカンピロバクター陰性であった。

検体 No. 13~30 の 18 検体のうち 13 検体で、脱羽後の *E. coli* 数は 10 cfu/25cm² を下回った。チラー後において、1 検体のみ 41 cfu/25cm² を示したものがみられたが、これを除く 17 検体は 5 cfu/25cm² 以下に抑えられていた。その上、焼烙後にはすべての検体で *E. coli* は検出されなかった。

検体 No. 15 から検出された、脱羽後の 1.4×10^2 cfu/25cm²、チラー後の 96 cfu/25cm² がともに 18 羽中最大の大腸菌群数であった。しかし、No. 15 を含むすべての検体で焼烙後には大腸菌群は検出されなかった。

一般生菌数は検体により様々な値を示し、脱羽後に $8.3 \times 10^1 \sim 4.1 \times 10^2$ cfu/25cm² の範囲で検出された。チラー後には 18 検体中 12 検体で

1.0 × 10² cfu/25cm² 未満であるなど、低い値に抑えられているものが多かった一方、18 検体中最大となる 1.8 × 10² cfu/25cm²を示したものを含む 4 検体で 10³ cfu/25cm²を超える一般生菌数が検出された。しかし、このような高い値を示した検体があったものの、焼烙後にはいずれの検体も 6 cfu/25cm² 以下であり、このうち 14 検体からは検出されなかった。

検体 No. 13 ~ 30 の 18 羽のうち、直腸スワブからカンピロバクターが検出されたのは 7 羽であった。鶏群ごとにみると、9 月採材の No. 13 ~ 18 の 6 羽中 5 羽(陽性率 83 %)、11 月採材の No. 19 ~ 24 の 6 羽中 2 羽(陽性率 33 %)であり、2 月採材の No. 25 ~ 30 の 6 羽はすべて陰性(陽性率 0 %)であった。分離されたカンピロバクターはいずれも *C. jejuni* であった。と体ふき取りの材料からは、工程に関わらずカンピロバクターは検出されなかった。

D. 考察

本調査の結果、加熱後のすべての検体でカンピロバクター陰性であったほか、一般に糞便汚染の指標菌とされている *E. coli* が、調査を行った 30 羽すべてにおいて加熱後に検出されなかったことから、本研究で調査を行った加工業者で施される焼烙の工程は糞便汚染を除去するのに十分な効果を示していると考えられた。また、チラーの条件に関わらず焼烙後に大腸菌群が検出されず、一般生菌数も 6 cfu/25cm² 以下に抑えられていたことは、焼烙の効果を際立たせる結果となった。

鶏肉に付着するカンピロバクターは主に食鳥の腸管内に由来すると考えられる。また、中抜き前のと体において、素囊からカンピロバクターが分離されたとの報告がある。同一食鳥処理場において、腸管内カンピロバクター陽性鶏群の処理後に陰性鶏群が解体された場合、陽性鶏群から陰性鶏群への交差汚染が起こることが報告

されている。本研究では、直腸スワブのカンピロバクター陰性鶏群であった検体 No. 24 ~ 30 において、食鳥処理のいずれの工程からもカンピロバクターは検出されなかった。これら 6 羽の前に処理された鶏群のカンピロバクター保有は明らかでないものの、今回交差汚染が起こったことを示唆する結果は少なくとも認められなかった。交差汚染の要因として、中抜き方式による解体の場合、中抜き機が腸管を破損することが挙げられる。また素囊からの汚染も考えられる。本研究で調査を行った食鳥処理場は外剥ぎ方式による解体を採用しており、腸管破損による腸内容物の漏出といった汚染の要因が発生しにくいことが奏功しているものと推測される。

本研究において、直腸スワブのカンピロバクター陽性率は、8 月、9 月、11 月、2 月採材の鶏群でそれぞれ 100 % (12/12)、83 % (5/6)、33 % (2/6)、0 % (0/6) であった。イギリスで実施された調査で、盲腸内容物からカンピロバクターの検出を試みた結果、7 月、8 月、9 月における鶏群陽性率がその他の月と比較して有意に高値であったと報告されている。また、アメリカでの調査で、小売り段階のと体におけるカンピロバクター陽性率が 5 月 ~ 10 月で特に高く (87 % ~ 97 %)、12 月 (6.7 %)、1 月 (33 %) で特に低かったとする研究もある。このように、初夏から秋季にかけてカンピロバクター保有率が高いことを指摘する報告に概ね一致する結果が本研究からも得られた。

以上のことから、本研究で調査を行った認定小規模食鳥処理場で実施されている生食用鶏肉加工において、次亜塩素酸ナトリウム (開始濃度 100 ppm) による消毒は今回のように処理羽数が少ない状況では一定の効果を示しており、またさらに表面の焼烙を加えることによりカンピロバクター汚染を十分に制御することが可能であると考えられる。

調査2

大規模食鳥処理場を通じて加工される生食用鶏肉におけるカンピロバクター汚染菌数の評価

B. 研究方法

1. 材料の採取

鹿児島県内の大規模食鳥処理場1か所において解体されたのち、加工場へ搬入され、生食用として加工された食鳥肉(もも肉、むね肉)について調査を行った。2017年6月と8月に1度ずつ、計2回採材を実施した。採材を行った加工場の工程表を図3(もも肉)、図4(むね肉)に示した。搬入後(原料)、加熱後(もも肉は焼烙後、むね肉はボイル後)、スライス後、包装後(製品)からそれぞれ、もも肉3検体、むね肉3検体ずつ(いずれも同一農場)採取し、2度の採材で2農場・合計48検体(もも肉、むね肉とも各6検体×4工程)の材料を得た。

2. MPN法によるカンピロバクター数の推定

検体25gをプレストン液体培地225mlに入れてストマッキングし、ここから10mlを3本分注するとともに、9ml、9.9mlプレストン液体培地にストマッキング液をそれぞれ1ml、0.1ml加えて希釈液を3本ずつ調製した。これらを培養後、1白金耳量をバツラー培地に画線塗布した。以降のカンピロバクター分離・同定法および培養条件は調査1に準ずる。

3. Polymerase Chain Reaction (PCR)によるカンピロバクターの種同定

調査1に準ずる。

4. *E. coli*数、大腸菌群数、一般生菌数の算定

各検体10gを滅菌生理食塩水90mlに加えてストマッキングし、滅菌生理食塩水を溶媒として10倍、100倍希釈液を調製した。ペトリフィルムECプレートにストマッキング液1mlを接種

し、ペトリフィルムACプレートに3段階の溶液をそれぞれ1ml接種した。37℃好気条件下で24時間培養後、指示書に基づきコロニー数を算定した。指示書の適正測定範囲に従い、菌数を導いた。

C. 研究結果

1. もも肉およびむね肉における各菌数の推移

もも肉およびむね肉から検出された*E. coli*数、大腸菌群数、一般生菌数、カンピロバクター数の各工程6検体の平均値の推移を図5-A、B、C、Dにそれぞれ示した。

もも肉原料からは0cfu/g~ 4.1×10^2 cfu/gの*E. coli*が検出された。加熱後に唯一 2.8×10^3 cfu/gを示した検体が認められたが、その他の5検体はすべて*E. coli*陰性であった。スライス後の検体および製品からは全く検出されなかった。

もも肉原料から検出された大腸菌群数は、 9.0×10 cfu/g~ 6.8×10^2 cfu/gの範囲であった。加熱後の4検体からは大腸菌群を検出しなかった一方、 4.0×10^3 cfu/gを数えた検体が1つ認められた。スライス後の2検体から 1.0×10 cfu/gの大腸菌群が検出され、その他の4検体からは検出されなかった。製品からは最大 7.0×10 cfu/gの大腸菌群を検出したが、製品の半数は大腸菌群陰性であった。

もも肉原料6検体のうち4検体で 10^4 cfu/gを上回る一般生菌が検出された。加熱後には1検体で 3.8×10^4 cfu/gを検出したものの、その他はおおむね低値であり、一般生菌が検出されなかったものも2検体みられた。スライス後の検体および製品からはそれぞれ、最大で 7.4×10^2 cfu/g、 1.5×10^3 cfu/gの一般生菌が検出された。

もも肉原料の1検体で 4.6×10^2 MPN/10gのカンピロバクターを検出したものの、これに次ぐ

2番目に高い値は 1.5×10 MPN/10g であり、おおむね低い値に抑えられていた。また加熱後以降の検体からカンピロバクターは検出されなかった。

むね肉原料の検体から検出された *E. coli* 数は、最大で 4.0×10 cfu/g であった。原料の6検体のうち4検体からは *E. coli* は検出されなかった。また、加熱後、スライス後、製品の検体からは一切検出されなかった。

大腸菌群は、むね肉原料の検体から 2.0×10 cfu/g ~ 3.7×10^2 cfu/g の範囲で検出された。加熱後の検体からは大腸菌群は検出されなかった。スライス後、製品の検体ではそれぞれ5検体、4検体で大腸菌群陰性であったほか、最大でも 1.0×10 cfu/g に抑えられていた。

むね肉原料から検出された一般生菌数は、 1.6×10^4 cfu/g を記録した1検体を除いて 5.0×10^3 cfu/g 以下であった。加熱後には、検出されなかった2検体を含め、すべての検体で 10^2 cfu/g 未満であった。

カンピロバクターは、原料から製品までのすべての検体で陰性であった。

2. もも肉とむね肉の間における汚染度の比較

各工程におけるもも肉とむね肉の2群間の汚染度を比較するため、各菌数平均値の差を解析した。解析に対数値を用いるため、算定値に0が含まれなかった原料の大腸菌群数、原料の一般生菌数および製品の一般生菌数について検討を行った。算定値の常用対数をとると、原料の大腸菌群数はもも肉で平均 2.4 log cfu/g、むね肉で平均 2.0 log cfu/g であった。また原料の一般生菌数はもも肉で平均 4.1 log cfu/g であったのに対してむね肉では平均 3.5 log cfu/g であった。製品の一般生菌数はもも肉で平均 2.6 log cfu/g、むね肉で平均 1.7 log cfu/g であった。対数値を用いて F 検定を行ったところ、3者

とも2群間で分散に有意差が認められなかったため ($p > 0.05$)、スチューデントの t 検定を行った。その結果、原料の一般生菌数および製品の一般生菌数において、もも肉とむね肉の群間に平均値の有意差が認められた ($p < 0.05$)。

D. 考察

本研究において、もも肉、むね肉ともに加熱後の検体からカンピロバクターは検出されなかった。鶏レバーにおいては、カンピロバクターを完全に殺菌するには中心温度 70 以上を2分~3分間持続することが必要であるとする報告がある。一方、鶏ミンチのパティ(厚さ 1.2 cm)について行われた研究では、人工的にカンピロバクターを接種した検体と接種しない検体をそれぞれフライパンで加熱した際、中心温度がそれぞれ 57.5、52.1 に達したときにカンピロバクターが検出限界以下 (< 10 cfu/g) となったことが報告されている。本研究では肉の温度について計測していないものの、もも肉焼烙の工程で加工場が定める目標値は表面 70 以上となっている。レバーは胆管等を通して表面だけでなく内部までカンピロバクターに汚染されていることがあるため、中心まで加熱することが求められる。一方、もも肉やむね肉は表面の汚染を制御することが重要であり、本研究の結果も踏まえると、湯通しまたは焼烙により表面が 70 以上に加熱されることで十分であると考えられる。

原料のもも肉から検出された *E. coli* 数は最大でも 4.1×10^2 cfu/g であったにも関わらず、加熱後のもも肉1検体から 2.8×10^3 cfu/g と著しく高い値が検出されたことは、表面焼烙の工程を終えるまでの間に何らかの衛生管理が不十分であった可能性を示唆している。一方、スライス後および製品の検体からは *E. coli* は検出されなかった。加えて、著しく高い *E. coli* 数を示した検体を含め、加熱後以降のすべての検体でカンピロバクター陰性であった。このことから、*E. coli*

による高度汚染は必ずしもカンピロバクター汚染を伴っていることを意味しないと考えられる。これは、福岡市が行った生食用鶏肉に関する調査で、 10^4 MPN/100g 以上と高い値の推定大腸菌が検出された検体の半数以上がカンピロバクター陰性であったことから裏付けられる。ただし、*E. coli* による汚染は食品衛生上好ましいものではなく、加熱ムラや加熱後の汚染などがないう、衛生管理においてより一層の配慮が必要である。

原料の検体において、もも肉の一般生菌数がむね肉より有意に高かったことから、もも肉は環境からの微生物汚染が高いことが示唆された。本研究で調査を行った加工場では、加熱の工程においてむね肉は湯通し 90 秒(湯:92)がなされるのに対して、もも肉には 30 秒の湯通し(湯:92)の後に焼烙が行われており、湯通しと焼烙が併用されている。もも肉の製品ではすべての検体で 1.5×10^3 cfu/g 以下、むね肉の製品では 1.0×10^2 cfu/g 以下となっており、加熱することによってもも肉、むね肉とも十分に汚染を抑えられていると考えられる。加えて、製品の一般生菌数においてむね肉がもも肉より有意に低いという結果となったことから、むね肉はとりわけ汚染が軽度であることが示唆された。

E. 結論

認定小規模食鳥処理場で解体・加工された食鳥と体表面のカンピロバクターは、チラー後以降の検体からは全く検出されなかった。*E. coli* (大腸菌数)や TC(大腸菌群数)は焼烙後に全て陰性となり、TVC(一般生菌数)も全ての検体で焼烙後に 6 cfu/g 以下となったことから、焼烙が糞便汚染の除去に大きく寄与していることが示唆された。

大規模食鳥処理場で解体され加工場へ搬入された生食用鶏肉(もも肉・むね肉)の加熱工程以降ではカンピロバクターはすべて陰性であった。

これらの結果から、表面加熱が十分にカンピロバクター低減効果を示していることが示唆された。

以上より、表面の焼烙を十分にを行い、かつ一連の加工工程の中で適切な取り扱いを徹底することによって、生食用鶏肉を安全に提供することが可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表等(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Ishihara K., Chuma T., Andoh M., Yamashita M., Asakura H., Yamamoto S.

「Effect of climatic elements on *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared in southern Japan from 2008 to 2012.」 *Poultry Sci.* (96) 931-937 2017.

2. 学会等発表

「認定小規模食鳥処理場で加工される生食用鶏肉の処理工程におけるカンピロバクター汚染菌数の評価」 第160回日本獣医学会(鹿児島市) 2017年9月13日

「認定小規模食鳥処理場の生食用鶏肉加工における焼烙のカンピロバクター汚染低減効果」 第38回日本食品微生物学会(徳島市) 2017年10月5日

「大規模食鳥処理場を通じて加工される生食用鶏肉のカンピロバクター汚染菌数の評価」 第66回九州地区日本獣医公衆衛生学会(宜野湾市) 2017年10月15日

「食鳥肉における微生物汚染低減策の有効性

実証事業の方向性」平成29年度鹿児島県獣
医公衆衛生講習会（鹿児島市）2017年10月
20日

「生食用食鳥肉加工工程における細菌汚染実
態調査」第10回日本カンピロバクター研究
会総会（宮崎市）2017年11月30日

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

2.実用新案登録

なし

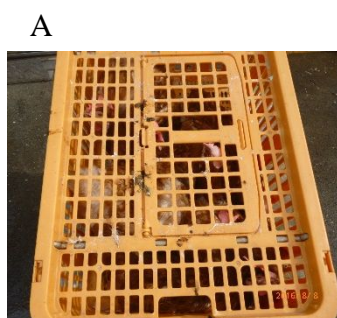
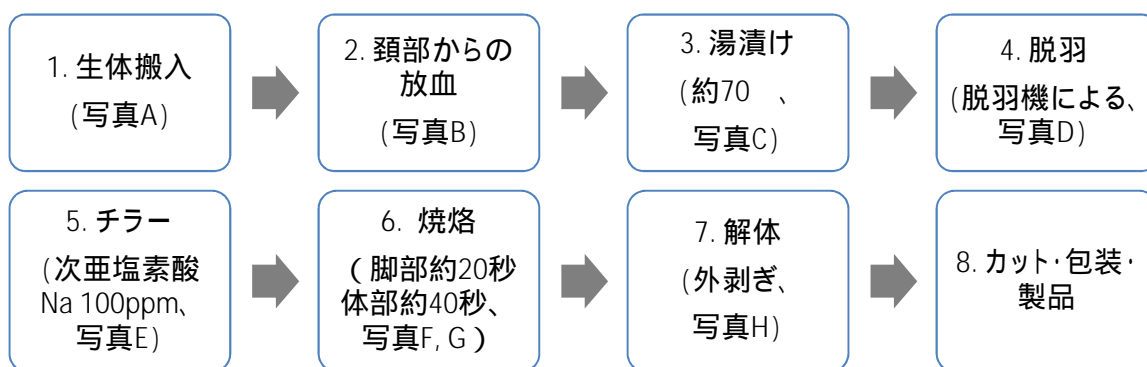


写真 A 搬入



写真 B 放血



写真 C 湯漬け



写真 D 脱羽



写真 E チラー

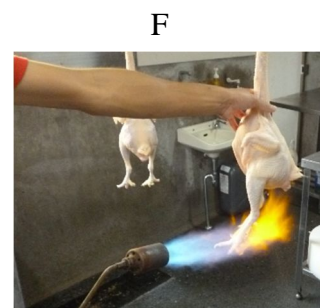


写真 F 焼烙(脚部)



写真 G 焼烙(体部)



写真 H 解体

図 1 採材元処理場の処理工程

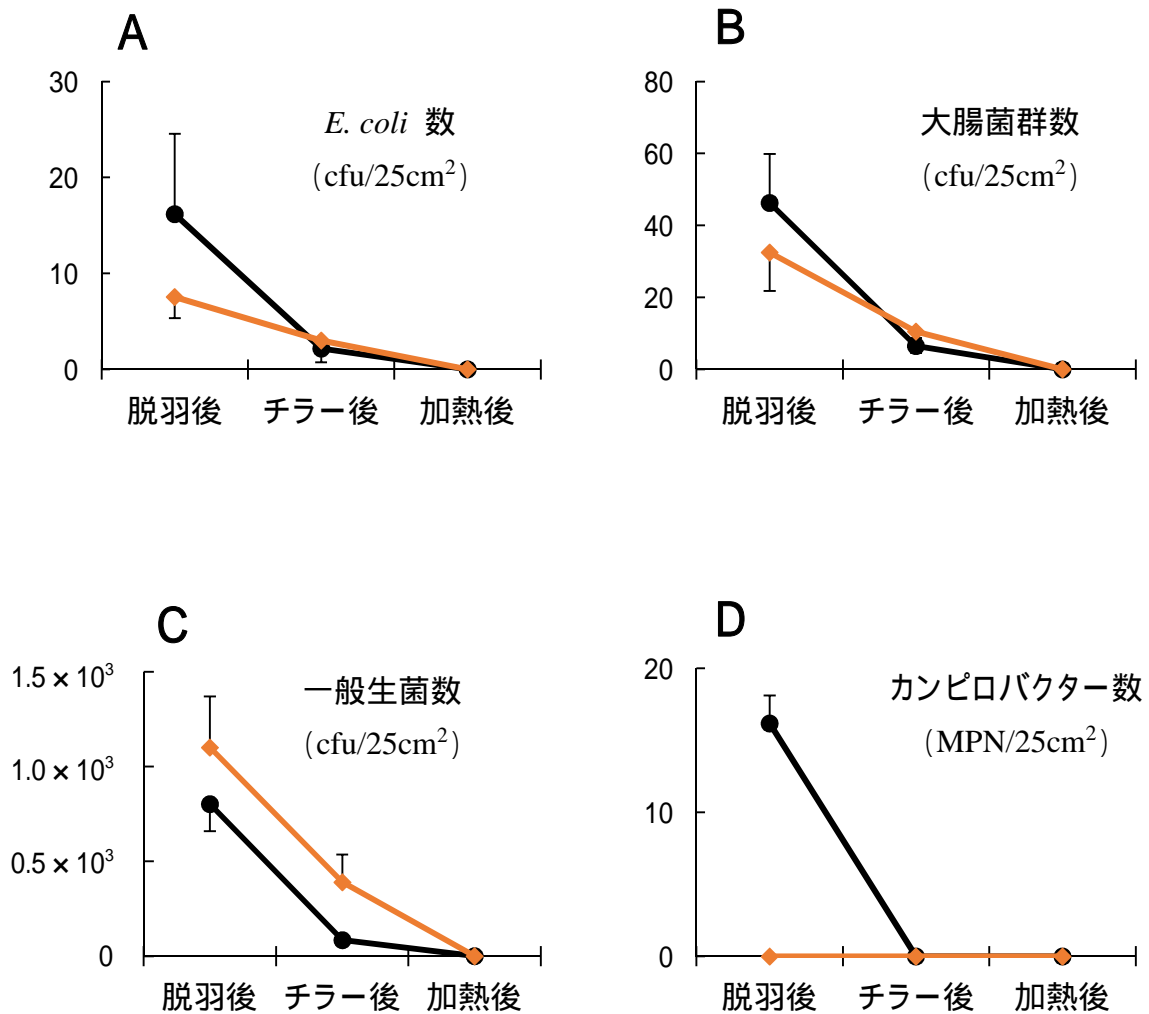


図2 各菌数の平均値の推移

(A)*E. coli* 数、(B)大腸菌群数、(C)一般生菌数、(D)カンピロバクター数

○: No. 1~12 の平均値、◇: No. 13~30 の平均値

エラーバーは標準誤差を表す。

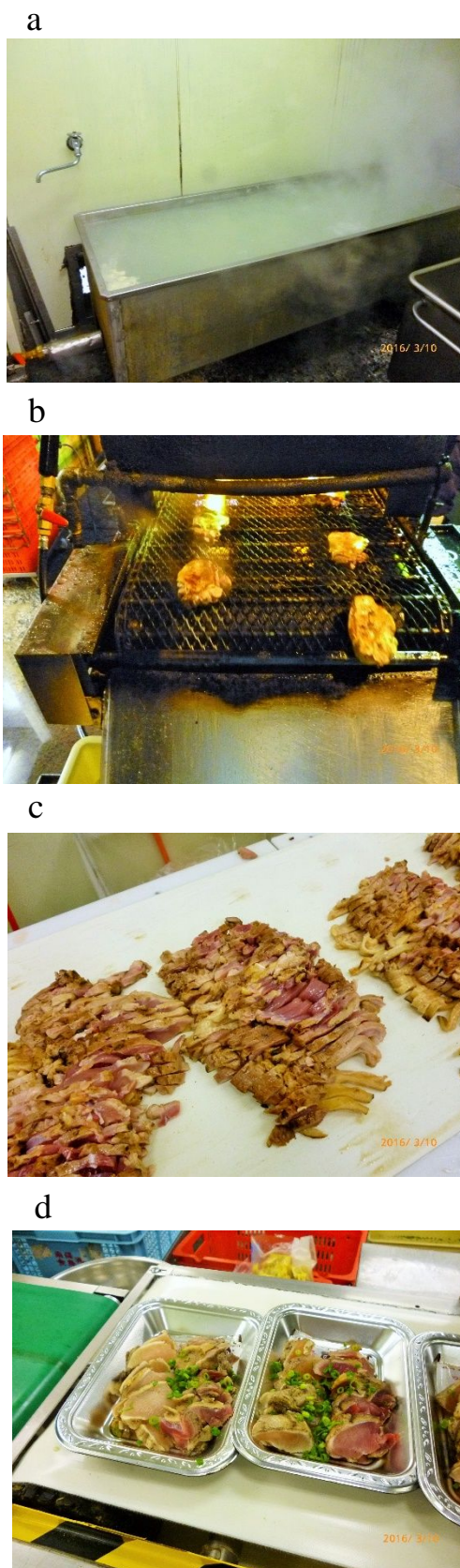
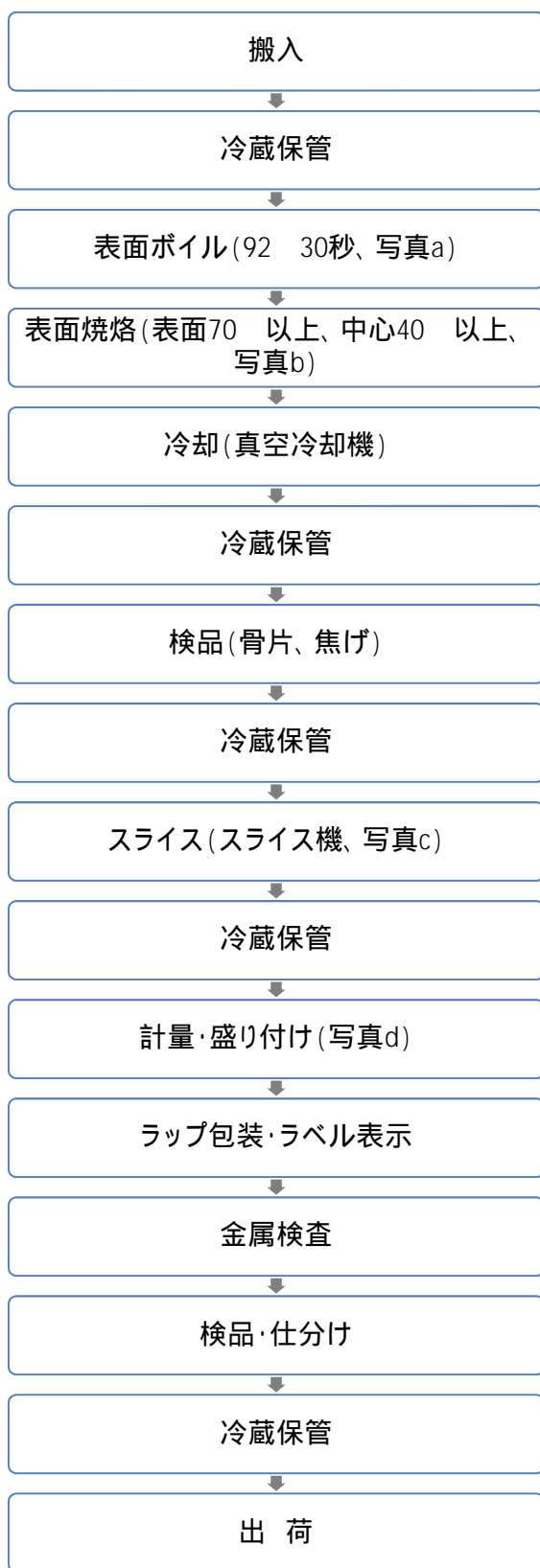


図3. もも肉加工工程 (写真 a : ポイル槽、b : 焼烙機、c : スライス後、d : 盛り付け後)

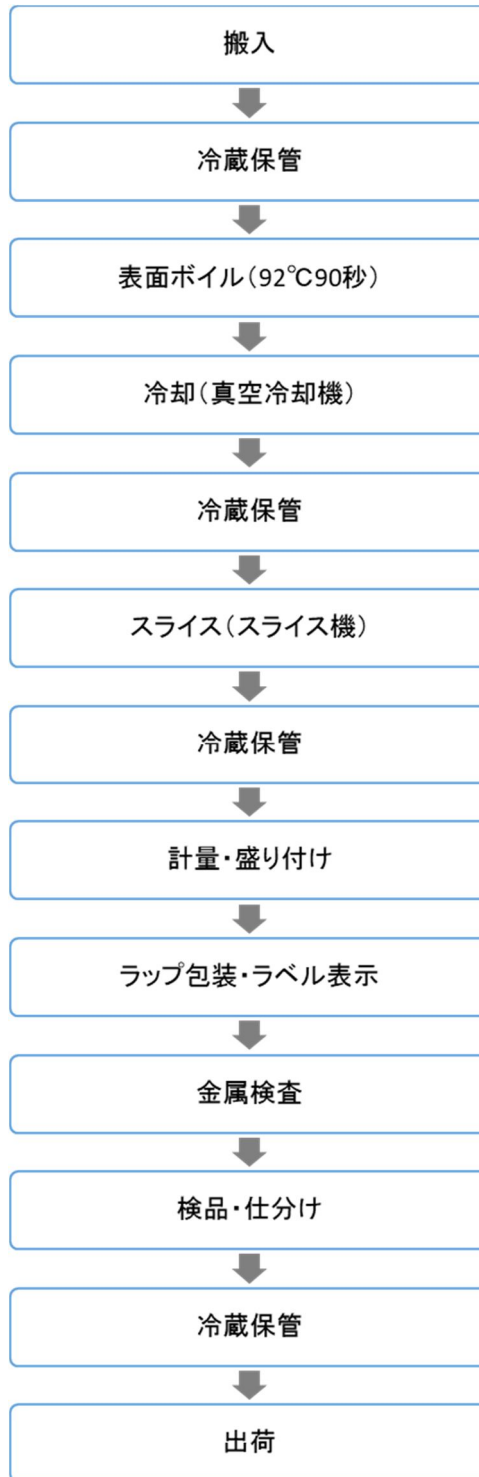


図4 むね肉加工工程

平成29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」
平成29年度分担研究報告書

宮城県および全国における積極的食品由来感染症病原体
サーベイランスならびに下痢症疾患の実態把握
（カンピロバクター症をはじめとする食品媒介感染症被害実態の推定）

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長
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第二室長
	桜井芳明	宮城県医師会健康センター所長
	小松真由美	宮城県医師会健康センター検査部検査科二科長
	玉井清子	株式会社ミロクメディカルラボラトリー
	坂上武文	株式会社ミロクメディカルラボラトリー
	滝 将太	株式会社ミロクメディカルラボラトリー
	霜島正浩	株式会社ビー・エム・エル
	渋谷俊介	株式会社 LSI メディエンス
	熊谷優子	国立感染症研究所国際協力室長
	齊藤剛仁	国立感染症研究所感染症疫学センター
	春日文子	国立環境研究所特任フェロー
	天沼 宏	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室
	田村 克	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室

研究要旨： 食中毒として報告されない散発症患者を含めた胃腸炎疾患の患者数を推定するため、宮城県の臨床検査機関の協力により、医療機関から検査依頼された下痢症検便検体からの病原菌検出数に関するアクティブ（積極的）サーベイランスを 2005 年から継続して行っている。本年度はまず宮城県における 2005～2016 年の病原菌検出状況の詳細解析および被害実態の推定を行った。臨床検査機関を対象としたアクティブサーベイランスのデータを用い、検査機関の住民カバー率、および宮城県で以前に行った夏期および冬期の 2 回の電話住民調査の結果から求めた検便実施率および医療機関受診率等の因子を推定モデルに導入することで、*Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* の 3 菌について、モンテカルロシミュレーション法により宮城県における当該菌による食品由来下痢症患者数の推定を行なった。これらの推定値から、全国での当該菌による食品由来下痢症患者の発生率が宮城県での発生率と同じであると仮定した時の全国の

当該菌による食品由来下痢症患者の数を推定した。2011年からはさらに全国を対象とした民間検査機関3社から全国についての病原菌検出数データを収集している。本年度は2016年のデータを収集し、2006～2016年の11年間のアクティブサーベイランスデータから全国における食品由来下痢症患者数の推定を行い、宮城県データからの全国推定値と比較した。

A. 研究目的

我が国では食品由来感染症の患者数は食品衛生法および感染症法にもとづいて報告されている。散発事例は食中毒事例として報告されない場合が多く、そのため食中毒統計等だけでは食品由来感染症・下痢症の患者数が正確に把握されていないことが示唆される。特に最近では広域散発事例による被害も報告されており、食品衛生行政における対策等の検討のためには、それらの事例も含めた被害実態の全容を把握することが重要と考えられる。

米国では1995年以降、FoodNet（フードネット）というアクティブ（積極的）サーベイランスシステムが導入され、食品衛生の各種対策及びその効果を検討するために食品由来感染症の実患者数の把握を継続して行なっている。FoodNetは全米10州の定点検査機関から病原体検出データを集約して分析している。さらに電話住民調査や検査機関調査等を継続して行い、各推定段階に必要なデータを得ることで全体推定を行なっている。このシステムで得られた推定結果は患者数の多年度にわたる変動の把握や各種行政施策の効果を検討する等、食品衛生行政に活用されている。

日本においても患者数の全容把握のために同様のシステムが必要と考えられるが、これまでに日本にはこうしたシステムが設置されてこなかった。下痢症の発生動向や

実態把握のための基礎データを蓄積することは、食中毒行政における食中毒対策立案、その効果の評価および各種リスク評価等にきわめて重要と考えられる。こうしたことをふまえ、本研究等において2005年より継続して宮城県においてアクティブサーベイランスを行い、これにより実患者数推定を行い、その有効性を実証し、日本におけるFoodNet様システム構築の基礎とすると同時に、そのようなシステムを日本に導入する際に検討すべき特徴の把握を行ってきた。

本年度は、(1)2005年から継続している宮城県におけるアクティブサーベイランス、およびそれによる宮城県の被害実態の推定を引き続き行った。また、(2)2011年からは民間検査機関3社の協力で全国についての病原菌検出データを収集し、それらをもとに全国における被害実態の推定を行っているが、本年度もこれを継続し、これらの結果を上記の宮城県データからの全国推定結果と比較することで本研究における推定手法の妥当性の検討を継続して行うこととした。

B. 研究方法

1. データ収集

下痢症患者の原因病原体のアクティブサーベイランスを行うために、宮城県内で医療機関の医師が便検査を依頼している検査

機関に協力を依頼し、その機関からのデータ収集を継続して行っている。また 2011 年からは民間検査機関 3 社より全国の菌検出数データを収集している。

宮城県の有症者（定義は 1-3 参照）の医療機関受診率および受診者の検便実施率は、同県において以前に行った電話住民調査の結果より推定された値を用いた。季節変動を考慮して冬期（2006 年）だけでなく夏期（2007 年）にも電話住民調査を行い、冬期の結果と比較検討の上、統合したデータから検便実施率および医療機関受診率を確率分布に当てはめて推定した。

1 - 1 . 宮城県の臨床検査機関からの同県のデータの収集

協力検査機関

- ・ 宮城県医師会健康センター
- ・ 宮城県塩釜医師会臨床検査センター

これら 2 機関での検便結果を集計した。

1 - 2 . 民間検査機関からの全国のデータの収集

協力検査機関

- ・ 株式会社ミロクメディカルラボラトリー
- ・ 株式会社ビー・エム・エル
- ・ 株式会社 LSI メディエンス

これら 3 社での全国を対象とした検便の結果を集計した。

1 - 3 . 全国および宮城県を対象とした急性下痢症に関する電話住民調査

宮城県を対象とした急性下痢症に関する冬期電話住民調査（2006 年 11 月 22 日～12 月 4 日、約 1 万人）および夏期電話住民調査（2007 年 7 月 14 日～7 月 27 日、約 1

万 2 千人）全国を対象とした急性下痢症に関する冬期電話住民調査（2009 年 12 月 5 日～12 月 24 日、全国約 1 万 2000 人）および 2 回の夏期電話住民調査（2014 年 7 月 11 日～8 月 3 日、全国約 1 万 3 千人を対象、2016 年 7 月 22 日～8 月 23 日、全国約 2 万 3 千人を対象）が行われ（表 2）、その結果は適宜報告されているが、ここでは以下に概略を示しておく。

電話調査は全て共通の質問票および手順にて行った。全国および宮城県内の一般家庭をランダムに選択し、バイアスを減少させるため家庭内で次に誕生日が来る予定の人に対して調査を行った。調査時点から過去 1 カ月以内に血便、24 時間以内に 3 回以上の下痢、もしくは嘔吐があったという有症者条件を満たし、かつ慢性胃腸疾患、飲酒、投薬、妊娠等の除外条件がなかった人を有症者とした。

2 . データ集計・解析

検査機関からの病原菌検出データおよび電話調査からのデータは Microsoft Excel を利用してコンピューターファイルに入力した。検査機関データの個人情報提供された時点で既に切り離されており、提供データから個人を特定することはできない。電話調査データは人数だけのデータであり個人情報は含まれていない。電話調査データは全国または地域の年齢人口分布にもとづき補正し、集計後に確率分布として推定モデルに導入した。モデルは@RISK ソフトウェア（Palaside 社）上にて作成し、1 万回の試行を行った。

3 . 宮城県における食品由来下痢症患者数

の推定

宮城県における菌種ごとの食品由来下痢症疾患被害推定のために、上記検査機関のデータから *Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* の 3 菌の検出数を抽出した。協力検査機関ではこれら 3 菌に関しては、全ての検体で検査を行なっている。検出数に対し、検査機関の住民カバー率による補正を行い、その結果を医療機関における受診者の検便実施率、および下痢症患者の医療機関受診率の推定値とともに推定モデルに導入することで宮城県での各菌による推定患者数を算出した。検査機関の住民カバー率は検査機関からの情報により 2 機関あわせて 52%と推定した。

検査機関菌検出データは 2016 年 1～12 月の新規データと 2005 年 1 月～2015 年 12 月までの 11 年分の既集計データを用いた。

検査機関における陽性検体からの菌検出率は 100%と仮定した。さらに米国における研究 (P. Mead et al., 1999) で、食品由来感染の割合を *Campylobacter* は 80%、*Salmonella* は 95%、*Vibrio parahaemolyticus* は 65%であるとそれぞれ推定していることから、これらの値を用いて宮城県における各菌の食品由来下痢症患者数を推定した。

4．宮城県についての推定結果から全国における食品由来下痢症患者数の推定

宮城県についての推定値より、全国での当該菌による食品由来下痢症患者の発生率が宮城県での発生率と同じであると仮定した時の全国の当該菌による食品由来下痢症患者数を推定した。このために総務省統計

局の Web ページに掲載されている人口統計データ (2010 年) を用いた。

5．全国についての検出数データから全国での食品由来下痢症患者数の推定

全国での菌種ごとの食品由来下痢症疾患被害推定のために、全国を対象としている民間検査機関 3 社の検査データから、*Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* の 3 菌の検出数を抽出し、菌ごとに年間の検出数を求めた。これに対し、検査機関の住民カバー率による補正を行い、その結果を医療機関における受診者の検便実施率および下痢症患者の医療機関受診率の推定値とともに推定モデルに導入することで各菌による推定患者数を算出した。

2010～2016 年については 3 社 (ミロクメディカルラボラトリー、ビー・エム・エル、LSI メディエンス)、2009 年については 2 社 (ビー・エム・エル、LSI メディエンス)、2006～2008 年については 1 社 (ビー・エム・エル) の検出数データを使用した。

各検査機関の住民カバー率は、各検査機関の腸管出血性大腸菌 (EHEC) (2009 年および 2010 年の LSI メディエンス) もしくは EHEC O157 (ミロクメディカルラボラトリー、ビー・エム・エル、2011 年以降の LSI メディエンス) の検出数を厚生労働省への全国届出数と比較することによりそれぞれの年度ごとに推定した (表 5)。

検便実施率および医療機関受診率としては、全国を対象として夏期に 2 回実施された電話住民調査 (2014 年 7～8 月、2016 年 7～8 月) および冬期に実施された電話

住民調査（2009年12月）のデータを統合し、その解析により得られた各推定値（図1、2）を用いた。

各検査機関における陽性検体からの菌検出率は100%と仮定した。さらに宮城県の場合と同様、Meadらの推定値を用いて全国における各菌の食品由来下痢症患者数を推定した。

C. 研究結果

1. 宮城県における2016年の病原細菌の検出状況

1-1. 概要

2016年に宮城県医師会健康センターおよび宮城県塩釜医師会臨床検査センターで実施した便検査件数は4,920件であった（表1）。

O血清型大腸菌（以下 *Escherichia coli* と記す）を含め何らかの病原性がある細菌（病原細菌）の検出は2,440件で、下痢症の原因となる細菌（下痢原性細菌）は、2,335件であった。

菌種別では、*Escherichia coli* が1,952件と下痢原性細菌の83.6%を占めた。以下、*Campylobacter* が282件（12.1%）、*Salmonella* が42件（1.8%）、*Aeromonas* が15件（0.6%）、*Yersinia* が13件（0.6%）、*Edwardsiella tarda* が6件（0.3%）、*Vibrio parahaemolyticus* が2件（0.1%）検出された。菌種別の順位について、1位 *Escherichia coli*、2位 *Campylobacter* と上位は過去3年間と同じ菌種で、この2菌種で下痢原性細菌の95%以上を占めた。ベロ毒素陽性検体数は21件で、7、9月（各

6件）と8月（5件）に多く検出されていた。

1-2. *Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* 検出数

宮城県における食品由来下痢症の被害推定の対象菌種として選定されている *Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* の検出状況についてまとめた（表1）。

Campylobacter の年間の検出数は282件で、月ごとの検出数は7月が36件と最も多く、次いで9月の33件、6、8月の各32件、10月の30件、11月の29件の順であった。

Salmonella の年間の検出数は42件で、9月の10件、4、7、8月の各5件、5、6、10月の各4件の順に多く検出された。

Vibrio parahaemolyticus の年間の検出数は2件で8月と10月の各1件であった。

2. 食品由来下痢症疾患実患者数推定の試み

2-1. 宮城県でのアクティブサーベイランスデータからの食品由来下痢症疾患実患者数の推定

Campylobacter、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* の3菌に関して、食品由来下痢症疾患の実患者数推定の試みを図3の考え方に沿って実施した。

2-1-1. 宮城県における年間検出数の推定

宮城県における食品由来下痢症の実患者数の把握に向けて、宮城県医師会健康セン

ターおよび宮城県塩釜医師会臨床検査センターでの菌検出データをもとに推定を行った。2005年に陽性であった検便検体数は両センターを合わせて、*Campylobacter* が562件、*Salmonella* が78件、*Vibrio parahaemolyticus* が36件であった。2006年は*Campylobacter*が550件、*Salmonella*が46件、*Vibrio parahaemolyticus*が27件、2007年は*Campylobacter*が538件、*Salmonella*が46件、*Vibrio parahaemolyticus*が24件、2008年は*Campylobacter*が468件、*Salmonella*が56件、*Vibrio parahaemolyticus*が8件、2009年は*Campylobacter*が339件、*Salmonella*が33件、*Vibrio parahaemolyticus*が6件、2010年は*Campylobacter*が354件、*Salmonella*が51件、*Vibrio parahaemolyticus*が15件、2011年は*Campylobacter*が324件、*Salmonella*が23件、*Vibrio parahaemolyticus*が7件、2012年は*Campylobacter*が262件、*Salmonella*が30件、*Vibrio parahaemolyticus*が3件、2013年は*Campylobacter*が226件、*Salmonella*が33件、*Vibrio parahaemolyticus*が5件、2014年は*Campylobacter*が252件、*Salmonella*が43件、*Vibrio parahaemolyticus*が4件、2015年は*Campylobacter*が271件、*Salmonella*が41件、*Vibrio parahaemolyticus*が4件、2016年は*Campylobacter*が282件、*Salmonella*が42件、*Vibrio parahaemolyticus*が2件であった(表3)。協力検査機関はあわせて宮城県の人口の約52%をカバーしているとの検査機関からの情報により、宮城県全体

での各菌の検出数を、2005年は*Campylobacter*が1,081件、*Salmonella*が150件、*Vibrio parahaemolyticus*が69件、2006年はそれぞれ1,058件、88件、52件、2007年はそれぞれ1,035件、88件、46件、2008年はそれぞれ900件、108件、15件、2009年はそれぞれ652件、63件、12件、2010年はそれぞれ681件、98件、29件、2011年はそれぞれ623件、44件、13件、2012年はそれぞれ504件、58件、6件、2013年はそれぞれ435件、63件、10件、2014年はそれぞれ485件、83件、8件、2015年はそれぞれ521件、79件、8件、2016年はそれぞれ542件、81件、4件と推定した。

2-1-2. 宮城県での有症者の医療機関受診率の推定

今回用いた推定値は、2006年と2007年の2回の電話住民調査の結果にもとづいて既に得られているものである。以下に当該電話住民調査の結果について説明する。

宮城県における電話住民調査では2006年冬期2,126件、2007年夏期2,121件の有効回答が得られた(有効回答率はそれぞれ21.2%、17.7%)。下痢症疾患の有病率は冬期が3.3%(70/2,126人)、夏期が3.5%(74/2,121人)であった(表2)。

冬期調査では有症者数は70人、医療機関受診者数は27人であり、夏期調査では有症者数は74人、医療機関受診者数は23人であった(表2)。これらのデータを宮城県の人口年齢分布で補正した後に統合し、ベータ分布を仮定してモデルに導入した結果、医療機関受診率の平均値は32.0%であった。

2-1-3. 宮城県での医療機関受診者の検便実施率の推定

今回用いた推定値は、2006、2007年の2回の電話住民調査の結果にもとづいて既に得られているものである。

上記電話住民調査において、冬期調査では下痢症による医療機関受診者数は27人、検便実施者数は4人、夏期調査では医療機関受診者数は23人、検便実施者数は2人であった(表2)。これらのデータを人口年齢分布で補正した後に統合し、ベータ分布を仮定してモデルに導入したところ、検便実施率の平均値は10.9%であった。

2-1-4. 宮城県における下痢症疾患による実患者数の推定

上記で検討した種々の係数を用いて推定した宮城県における下痢症疾患による実患者数の平均値は、*Campylobacter* が年別に37,019(2005)、36,238(2006)、35,437(2007)、30,786(2008)、26,272(2009)、23,291(2010)、21,331(2011)、17,256(2012)、14,878(2013)、16,600(2014)、17,835(2015)、18,548(2016)人であった。*Salmonella* は5,134(2005)、3,028(2006)、3,028(2007)、3,690(2008)、2,169(2009)、3,358(2010)、1,515(2011)、1,973(2012)、2,174(2013)、2,831(2014)、2,698(2015)、2,765(2016)人であった。*Vibrio parahaemolyticus* は2,369(2005)、1,778(2006)、1,582(2007)、527(2008)、395(2009)、988(2010)、460(2011)、197(2012)、329(2013)、263(2014)、263(2015)、132(2016)人と推定された(表3)。宮城県(人口236万人)の人口

10万人あたりの下痢症疾患実患者数として表すと、*Campylobacter*は1,569(2005)、1,536(2006)、1,502(2007)、1,305(2008)、1,113(2009)、987(2010)、904(2011)、731(2012)、630(2013)、703(2014)、755(2015)、786(2016)人と推定された。*Salmonella*は10万人あたり218(2005)、128(2006)、128(2007)、156(2008)、92(2009)、142(2010)、64(2011)、84(2012)、92(2013)、120(2014)、114(2015)、117(2016)人、*Vibrio parahaemolyticus*は10万人あたり100(2005)、75(2006)、67(2007)、22(2008)、17(2009)、42(2010)、20(2011)、8(2012)、14(2013)、11(2014)、11(2015)、6(2016)人とそれぞれ推定された(表3)。

2-1-5. 宮城県における食品由来下痢症実患者数の推定とその食中毒患者報告数との比較

上記で推定された下痢症患者数にはヒト-ヒト感染、動物との接触感染等、食品由来でないものを原因とする被害が多く含まれており、食品由来感染の患者数の把握には更なる推定が必要である。米国のMeadらの研究では菌種ごとに食品由来感染の割合を*Campylobacter*は80%、*Salmonella*は95%、*Vibrio parahaemolyticus*は65%と推定しており、ここではこれらの値を用いて食品由来下痢症患者数の推定を行った。その結果、食品由来下痢症患者数は年別に、*Campylobacter*が29,615(2005)、28,990(2006)、28,350(2007)、24,629(2008)、21,018(2009)、18,633(2010)、17,065(2011)、13,805(2012)、11,902(2013)、13,280(2014)、14,268(2015)、14,838

(2016)人、*Salmonella* が 4,877(2005) 2,877(2006) 2,877(2007) 3,506(2008) 2,061(2009) 3,190(2010) 1,439(2011) 1,874(2012) 2,065(2013) 2,689(2014) 2,563(2015) 2,627(2016)人、*Vibrio parahaemolyticus* が 1,540(2005) 1,156(2006) 1,028(2007) 343(2008) 257(2009) 642(2010) 299(2011) 128(2012) 214(2013) 171(2014) 171(2015) 86(2016)人と推定された(表3)

宮城県における食中毒患者報告数は年別に、*Campylobacter* が 143(2005) 109(2006) 32(2007) 33(2008) 9(2009) 25(2010) 9(2011) 52(2012) 8(2013) 32(2014) 5(2015) 7(2016)人、*Salmonella* が 12(2005) 11(2006) 25(2007) 0(2008) 23(2009) 13(2010) 0(2011) 12(2012) 0(2013) 0(2014) 0(2015) 0(2016)人、*Vibrio parahaemolyticus* が 32(2005) 0(2006) 627(下記参照)(2007) 37(2008) 19(2009) 16(2010) 0(2011) 1(2012) 0(2013) 0(2014) 0(2015) 0(2016)人であった(表3)。2007年の *Vibrio parahaemolyticus* 食中毒患者報告数 627人のうち 620人は1件のアウトブレイクの患者であり、宮城県を含む東日本1都7県の患者を、原因食品の製造事業所の所在地であった宮城県がとりまとめて報告したものである。2007年に宮城県内で発生した *Vibrio parahaemolyticus* 患者の報告数は、当該アウトブレイク患者のうち宮城県外の 610名を除外した 10人とそれ以外の 7人の合計 17人であった。

2-1-6. 全国を対象とした 2016 年夏、2014 年夏および 2009 年冬の電話住民調査の結果の概要

2016 年夏、2014 年夏および 2009 年冬に全国を対象に行われた電話住民調査の結果について以下に記載する(表2)

2016 年 7 月 22 日~8 月 23 日、2014 年 7 月 11 日~8 月 3 日、2009 年 12 月 5 日~12 月 24 日のそれぞれ約 3 週間に全国約 2 万 3 千人、約 1 万 3 千人、約 1 万 2 千人を対象として下痢症に関する電話住民調査が行われた。有効回答率は 2016 年調査が 13.3%(3,020 件) 2014 年調査が 15.2%(2,039 件) 2009 年調査が 16.9%(2,077 件)であった。

下痢症有症者数はそれぞれ 96 人(2016) 90 人(2014) 77 人(2009)で、従って下痢症有病率はそれぞれ 3.2%、4.4%、3.7%であった。

2-1-7. 宮城県についての推定値を用いた全国の商品由来下痢症患者数の推定およびその全国の食中毒患者報告数との比較

上述するように、宮城県における 2006、2007 年の電話住民調査と、2009、2014、2016 年の全国における電話住民調査とで下痢症有病率が全国の方が宮城県より概ね高い結果が得られた(表2)ことから、宮城県の推定値から人口比で全国の推定値を算出しても過大推定にはならないと考えられた。そこで、宮城県における推定食品由来患者数(表3)に、宮城県と全国の人口比を乗ずることで全国推定を行った(表4)

全国における下痢症の推定食品由来患者数は年別に、*Campylobacter* が 1,603,178(2005) 1,569,344(2006) 1,534,698

(2007)、 1,333,266 (2008) 1,137,788 (2009)、 1,008,678 (2010)、 923,796 (2011) 747,320(2012) 644,303(2013) 718,899(2014) 772,384(2015) 803,240 (2016)人、*Salmonella*が 264,011(2005) 155,743(2006) 155,743(2007) 189,794 (2008) 111,570(2009) 172,687(2010) 77,899(2011) 101,447(2012) 111,787 (2013) 145,566(2014) 138,745(2015) 142,210 (2016) 人、*Vibrio parahaemolyticus* が 83,366 (2005)、 62,579 (2006) 55,650 (2007) 18,568 (2008) 13,912(2009) 34,754(2010) 16,186 (2011)、 6,929 (2012)、 11,585 (2013) 9,257 (2014) 9,257 (2015) 4,656(2016)人とそれぞれ推定された(表 4)

全国の食中毒患者報告数は年別に、*Campylobacter* が 3,439 (2005) 2,297 (2006) 2,396 (2007) 3,071 (2008) 2,206(2009) 2,092(2010) 2,341(2011) 1,834(2012) 1,551(2013) 1,893(2014) 2,089(2015) 3,272(2016)人、*Salmonella* が 3,700 (2005) 2,053 (2006) 3,603 (2007) 2,551 (2008) 1,518 (2009) 2,476(2010) 3,068(2011) 670(2012) 861(2013) 440(2014) 1,918(2015) 704 (2016) 人、*Vibrio parahaemolyticus* が 2,301 (2005) 1,236 (2006) 1,278 (2007) 168 (2008) 280 (2009) 579 (2010) 87 (2011) 124 (2012) 164 (2013) 47 (2014) 224 (2015) 240 (2016) 人であった(表 4)

2-2 全国についてのアクティブサーベイランスデータからの全国の食品由来下痢症

疾患実患者数の推定

2-2-1. 各検査機関の住民カバー率の推定

全国の食品由来下痢症の実患者数把握に向けて、民間検査機関 3 社の菌検出データをもとに推定を行った。

住民カバー率は、可能な限り EHEC O157 検出数を使用して推定した。LSI メディエンスの 2009 年および 2010 年のデータについては、EHEC O157 の検出数データが得られなかったためこれらの年のカバー率は EHEC の検出数に依った。

得られたカバー率をまとめると、2016 年はミロクメディカルラボラトリーが 1.2%、ビー・エム・エルが 14.0%、LSI メディエンスが 4.0%、2015 年はミロクメディカルラボラトリーが 1.2%、ビー・エム・エルが 14.8%、LSI メディエンスが 3.7%、2014 年はミロクメディカルラボラトリーが 1.5%、ビー・エム・エルが 15.4%、LSI メディエンスが 4.0%、2013 年はミロクメディカルラボラトリーが 1.4%、ビー・エム・エルが 16.7%、LSI メディエンスが 2.9%、2012 年はミロクメディカルラボラトリーが 1.8%、ビー・エム・エルが 15.7%、LSI メディエンスが 2.9%、2011 年はミロクメディカルラボラトリーが 1.2%、ビー・エム・エルが 11.4%、LSI メディエンスが 3.1%、2010 年はミロクメディカルラボラトリーが 1.5%、ビー・エム・エルが 12.1%、LSI メディエンスが 2.2%、2009 年はビー・エム・エルが 11.7%、LSI メディエンスが 2.7%であった。そこで 2016~2010 年は 3 社合計のカバー率とし、2016 年は 19.1%、2015 年は 19.7%、2014 年は 20.9%、

2013年は21.0%、2012年は20.4%、2011年は15.7%、2010年は15.8%が得られた(表5)。2009年はビー・エム・エルとLSIメディエンスの2社合計で14.4%であった。2006~2008年についてはビー・エム・エル1社の各年のカバー率(2006年は8.5%、2007年は7.1%、2008年は10.0%)を使用した。

2-2-2. 全国における年間菌検出数の推定

民間検査機関における2006年(1社)の菌検出数は、*Campylobacter*が10,144件、*Salmonella*が1,888件、*Vibrio parahaemolyticus*が523件、2007年(1社)は*Campylobacter*が10,962件、*Salmonella*が1,886件、*Vibrio parahaemolyticus*が421件、2008年(1社)は*Campylobacter*が12,934件、*Salmonella*が1,894件、*Vibrio parahaemolyticus*が216件、2009年(2社)は*Campylobacter*が14,057件、*Salmonella*が2,059件、*Vibrio parahaemolyticus*が227件、2010年(3社)は*Campylobacter*が15,401件、*Salmonella*が2,434件、*Vibrio parahaemolyticus*が563件、2011年(3社)は*Campylobacter*が14,950件、*Salmonella*が2,705件、*Vibrio parahaemolyticus*が351件、2012年(3社)は*Campylobacter*が12,794件、*Salmonella*が2,258件、*Vibrio parahaemolyticus*が312件、2013年(3社)は*Campylobacter*が13,947件、*Salmonella*が2,324件、*Vibrio parahaemolyticus*が287件、2014年(3

社)は*Campylobacter*が16,762件、*Salmonella*が2,726件、*Vibrio parahaemolyticus*が209件、2015年(3社)は*Campylobacter*が18,164件、*Salmonella*が2,728件、*Vibrio parahaemolyticus*が138件、2016年(3社)は*Campylobacter*が18,547件、*Salmonella*が2,689件、*Vibrio parahaemolyticus*が232件であった(表6)。これらの検出数と各社の推定カバー率の合計を用いて、全国における年間菌検出数を推定した。その結果、全国での各菌の検出数は、2006年は*Campylobacter*が119,341件、*Salmonella*が22,212件、*Vibrio parahaemolyticus*が6,153件、2007年はそれぞれ154,423件、26,563件、5,930件、2008年はそれぞれ129,340件、18,940件、2,160件、2009年はそれぞれ97,618件、14,299件、1,576件、2010年はそれぞれ97,475件、15,405件、3,563件、2011年はそれぞれ95,223件、17,229件、2,236件、2012年はそれぞれ62,716件、11,069件、1,529件、2013年はそれぞれ66,414件、11,067件、1,367件、2014年はそれぞれ80,201件、13,043件、1,000件、2015年はそれぞれ92,203件、13,848件、701件、2016年はそれぞれ96,876件、14,045件、1,212件であると推定された。

2-2-3. 全国における食品由来下痢症疾患の実患者数の推定

全国を対象とした下痢症に関する電話住民調査は2009年冬、2014年夏、および2016年夏の計3回行われている(表2)。そこでこれらのデータを全国の人口年齢分布で補正後、統合し、ベータ分布を仮定し

てモデルに導入し、全国の医療機関受診率および検便実施率を推定した。その結果、全国の医療機関受診率は25.5%、全国の検便実施率は4.8%とそれぞれ推定された(図1、2)。これらを用いて、全国における下痢症疾患の実患者数を推定した(表6)。

推定された実患者数の平均値は、*Campylobacter* では年別に 13,084,001 (2006) 16,939,998 (2007) 14,198,429 (2008) 10,707,971 (2009) 10,687,320 (2010) 10,443,399 (2011) 6,880,816 (2012) 7,286,661 (2013) 8,796,321 (2014) 10,108,930 (2015) 10,641,732 (2016) 人であった。*Salmonella* では 2,435,193 (2006) 2,914,508 (2007) 2,079,158 (2008) 1,568,451 (2009) 1,689,042 (2010) 1,889,592 (2011) 1,212,503 (2012) 1,213,198 (2013) 1,430,543 (2014) 1,518,232 (2015) 1,542,870 (2016) 人であった。*Vibrio parahaemolyticus* では 674,579 (2006) 650,587 (2007) 237,116 (2008) 172,918 (2009) 390,686 (2010) 245,193 (2011) 167,799 (2012) 149,944 (2013) 109,678 (2014) 76,802 (2015) 133,115 (2016) 人と推定された。

日本全国(人口1億2777万人)の人口10万人あたりの下痢症疾患実患者数は、*Campylobacter* が 10,262 (2006) 13,286 (2007) 11,136 (2008) 8,398 (2009) 8,382 (2010) 8,191 (2011) 5,397 (2012) 5,715 (2013) 6,899 (2014) 7,929 (2015) 8,347 (2016) 人、*Salmonella* が 1,910 (2006) 2,286 (2007) 1,631 (2008) 1,230 (2009) 1,325 (2010) 1,482 (2011) 951 (2012) 952 (2013) 1,122 (2014)

1,191 (2015) 1,210 (2016) 人、*Vibrio parahaemolyticus* が 529 (2006) 510 (2007) 186 (2008) 136 (2009) 306 (2010) 192 (2011) 132 (2012) 118 (2013) 86 (2014) 60 (2015) 104 (2016) 人とそれぞれ推定された。

宮城県についての推定の場合(2-1-5参照)と同様にMeadらの結果を適用することにより、全国における下痢症の食品由来実患者数が年別に、*Campylobacter* が 10,467,201 (2006) 13,551,998 (2007) 11,358,743 (2008) 8,566,377 (2009) 8,549,856 (2010) 8,354,719 (2011) 5,504,652 (2012) 5,829,329 (2013) 7,037,057 (2014) 8,087,144 (2015) 8,513,386 (2016) 人、*Salmonella* が 2,313,433 (2006) 2,768,783 (2007) 1,975,200 (2008) 1,490,028 (2009) 1,604,590 (2010) 1,795,112 (2011) 1,151,878 (2012) 1,152,538 (2013) 1,359,046 (2014) 1,442,320 (2015) 1,465,727 (2016) 人、*Vibrio parahaemolyticus* が 438,477 (2006) 422,882 (2007) 154,126 (2008) 112,397 (2009) 253,946 (2010) 159,375 (2011) 109,069 (2012) 97,464 (2013) 71,291 (2014) 49,921 (2015) 86,525 (2016) 人とそれぞれ推定された(表6)。

日本全国における人口10万人あたりの下痢症の食品由来実患者数は、*Campylobacter* が 8,210 (2006) 10,629 (2007) 8,909 (2008) 6,719 (2009) 6,706 (2010) 6,553 (2011) 4,317 (2012) 4,572 (2013) 5,519 (2014) 6,343 (2015) 6,677 (2016) 人、*Salmonella* が 1,815 (2006) 2,172 (2007) 1,549 (2008)

1,169(2009) 1,259(2010) 1,408(2011) 903(2012) 904(2013) 1,066(2014) 1,131(2015) 1,150(2016)人、*Vibrio parahaemolyticus* が 344(2006) 332(2007) 121(2008) 88(2009) 199(2010) 125(2011) 86(2012) 76(2013) 56(2014) 39(2015) 68(2016)人とそれぞれ推定された(表6)。

なお表6には2006～2016年の*Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus*の全国食中毒患者報告数も示してある。

D. 考察

宮城県の臨床検査機関のデータからの食品由来下痢症疾患実患者数の推定では、2005～2016年の12年間を通じて、推定食品由来下痢症患者数は食中毒統計や病原微生物検出情報での報告数より大幅に多いことが確認された。また推定食品由来下痢症患者数と食中毒患者報告数の経年変化が*Vibrio parahaemolyticus*の場合を除いて互いに連動しているとは言えないことから、現行の食中毒および病原微生物に関する報告システムによって食品由来下痢症の実患者数を正確に把握し、経年変動等を評価することは困難であることが示唆された。より正確な患者数を把握するための補完システムとしてアクティブサーベイランスシステムの構築およびその活用が必要であり、そのアクティブサーベイランスシステムにおいて最も重要なことは継続性であると考えられた。

2011年からは全国を対象としている民間検査機関3社(年によって社数は異なる)

から2006年以降の全国の菌検出データを収集し、これをもとに全国の食品由来下痢症疾患実患者数の推定も行っている。宮城県の場合と同様、2006～2016年の調査期間を通じて推定食品由来下痢症患者数は食中毒統計や病原微生物検出情報での報告数より大幅に多いことが確認された。また11年間の推定結果を検討した結果、宮城県の場合と同様、推定食品由来下痢症患者数と食中毒患者報告数の経年変化は互いに連動しているとは言えないことが確認された。

全国データからの全国の食品由来下痢症推定患者数は、宮城県データからの人口比による全国推定結果と比較して、*Campylobacter*では6.7～10.6倍、*Salmonella*では9.3～23.0倍、*Vibrio parahaemolyticus*では5.4～18.6倍の違いがあった(表7)。宮城県と全国とで下痢症疾患有病率に大きな差は認められない(表2)ことから、この違いはそれぞれの推定に用いた検査機関住民カバー率、医療機関受診率、検便実施率などにより生じたと考えられる。住民カバー率の推定の方法は、宮城県の検査機関と全国を対象とする民間検査機関とで異なっている(前者は専門家の意見、後者はEHEC O157やEHECの検出数)。また受診率、検便率の推定は、宮城県の場合、2006年と2007年に行われた電話住民調査の結果にもとづいており、これに対し全国の場合は2009年、2014年、2016年に行われた調査にもとづいている。2006～7年と2009～2014年さらには2016年との間に有症者の医療機関受診行動や医師の検便実施行動に変化が起きている可能性も考えられる。以上のような種々の推定値の全国と宮城県における違いが、推定結

果の違いをもたらしている可能性がある。

今回の食品由来下痢症患者数推定において、宮城県の検査機関については専門家からの情報で住民カバー率を推定した。しかし専門家の情報には不確定な要素が含まれている可能性がある。宮城県の検査機関の住民カバー率の推定に EHEC 検出数による手法を試みたが検出数が少ないためにカバー率の年ごとのばらつきが大きくなり、推定に用いるのは現実的ではないと考えられた。全国を対象とした検査機関の場合は EHEC O157 (または EHEC) の検出数が宮城県の場合より大幅に多いため、推定結果のばらつきは宮城県の場合より小さいと考えられる。しかし特定地域において EHEC O157 (または EHEC) による大規模アウトブレイクが発生した場合はカバー率の推定に影響が出ることが予想されることに注意が必要である。複数年にわたるアクティブサーベイランスによりカバー率を把握することでその影響を少なくすることが可能であると考えられ、今後も継続したアクティブサーベイランスが必要であると考えられる。

本研究では食品由来下痢症の患者数は米国における研究成果を適用し、各菌の食品由来感染の割合を 65%~95%と仮定して推定したが、米国と日本の食習慣の違い等から、今回適用した値が妥当であるかは今後の検討課題である。日本においては米国と比較して生食が多いことから、日本における上記 3 菌の食品由来感染の割合は米国よりも高い可能性がある。

食中毒に対する各種対策等の検討およびその効果の評価を行なうためには継続した

定量的な実患者数の把握が必要であり、本研究での推定値は不確実性が大きい要素等が含まれた推定値ではあるものの、実患者数の幅を科学的に推定することができ、その推定結果から、実患者数が報告数より大幅に多い可能性が定量的、かつ多年度について示すことができた点が重要であると考ええる。

E. 結論

宮城県および全国におけるアクティブサーベイランスを複数年について行うことで、下痢症患者の菌検出データを継続して収集し、下痢症発生実態の概略およびその動向の把握が可能となった。

宮城県の臨床検査機関での *Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* の年間検出数、検査機関の住民カバー率、医療機関における検便実施率、医療機関受診率等の各種データを組み合わせることで、宮城県内での上記 3 菌に起因する食品由来下痢症患者数の推定を行い、さらにこれより全国の食品由来下痢症の患者数を全国と宮城県の人口比を用いて推定し、それらの結果を宮城県および全国の食中毒患者報告数とそれぞれ比較した(表 3、4)。その結果、食中毒患者報告数よりも大幅に多くの患者が存在している可能性が示唆された。全国レベルで、*Campylobacter* では約 250~680 倍、*Salmonella* では約 25~330 倍、*Vibrio parahaemolyticus* では約 20~200 倍の患者が存在している可能性が考えられた。

2016 年は 2015 年に比べ *Salmonella* の全国食中毒患者報告数が急減しているにも

かかわらず、推定食品由来患者数（および菌検出数）は宮城県からの推定および全国からの推定のどちらも大きく変化していなかった（表7）。これは2015年の *Salmonella* の報告事例の急増はアウトブレイク等の地域的な偏りがあるものに由来することを示唆し、全体の変動を検討する上で、そのような事例から大きな影響を受けることの少ない本研究のような全国的な長期的アクティブサーベイランスの重要性が示されたと考えられる。また、11年間の各菌の推定患者数と報告患者数の経年変化は互いに連動しているとは言えず、食中毒統計の報告数だけで実患者数の変動を把握することは難しいことが示唆された。

11年間（2006～2016年）の全国レベルのアクティブサーベイランスデータから同様に上記3菌に起因する全国の食品由来下痢症実患者数を推定し全国の食中毒患者報告数と比較したところ、*Campylobacter* では約2,600～5,600倍、*Salmonella* では約580～3,000倍、*Vibrio parahaemolyticus* では約220～1,800倍の患者が存在している可能性が示された。宮城県データからの全国推定と比較した場合は5.4～23倍程度の違いであった（表7）。宮城県データからの推定の場合と同様、2016年は全国データから推定した *Salmonella* の推定食品由来患者数は2015年に比べて大きく変化しておらず、全国の食中毒患者報告数の動向と連動していなかった。

今後も異なる規模や地域のデータからの推定結果を比較することで、年ごとの推定値の検証等に活用することが可能であると考えられる。さらに宮城県以外の地域でもアクティブサーベイランスを行い、宮城県

推定や全国推定と比較することによって地域性等の検討がより詳細に可能になると考えられる。また全国データについての住民カバー率のより詳細な推定、全国でのより大規模な電話住民調査による医療機関受診率および検便実施率の推定等により精度を向上させることも考えられる。

これらの結果から平常時から散発事例等を含めたデータ収集を継続して行うアクティブサーベイランスシステムの有効性およびその必要性が強調された。このようなサーベイランスシステムでは、菌の検出のみならず、下痢症発生率（有病率）医療機関受診率および検便実施率等の情報も継続して調査を行なうことでアウトブレイク等の特殊事例の影響を最小限にすることができ、より現実に即した実態把握が可能となることが示唆される。また継続調査により各項目の動向把握が可能となり、緊急事例の早期発見につながる可能性がある。菌検出件数を把握する検査機関データは、報告率等の不確定要素が少なく、推定を行う上でより直接的なデータであると考えられる。全国的食品由来下痢症実患者数のより正確な把握と地域性等の把握のために、より拡大したアクティブサーベイランスを行なうこと、および各不確定要素の推定の精度向上を図っていくことが今後の検討課題である。

引用文献：

Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe.
Food-related illness and death in the United States.

Emerging Infectious Diseases, 5:607–625.
1999.

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

窪田邦宏、天沼 宏、桜井芳明、小松真由美、玉井清子、坂上武文、滝 将太、霜島正浩、山下知成、熊谷優子、春日文子
全国を対象として新たに実施した下痢症に関する電話住民調査と、その結果を利用したカンピロバクター、サルモネラ、腸炎ビブリオに起因する食中毒被害実態の推定
(2006～2015年)

第38回日本食品微生物学会(2017年10月) 徳島市

窪田邦宏、田村 克、天沼 宏、今川正紀、中地佐知江、溝口嘉範、熊谷優子
全国における食品への異物混入被害実態の把握

第113回日本食品衛生学会学術講演会
(2017年11月) 東京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 1 . 宮城県における病原細菌の検出状況 (2016 年)

		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
検査件数		296	365	404	294	357	442	464	520	494	384	442	458	4,920
下痢 症 原 因 細 菌	<i>Escherichia coli</i>	104	142	176	118	142	159	192	206	209	147	159	198	1,952
	<i>Campylobacter sp</i>	12	14	17	11	23	32	36	32	33	30	29	13	282
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	4		2	2	2	2	2	3	4		23
	<i>Yersinia sp</i>		1			5	1	1	3	1	1			13
	<i>Salmonella sp</i>	1		2	5	4	4	5	5	10	4	1	1	42
	<i>Aeromonas sp</i>				1	2	1	1	2	5	3			15
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>								1		1			2
	<i>Vibrio fluvialis</i>													0
	<i>Vibrio cholerae</i>													0
	<i>Vibrio mimicus</i>													0
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>													0
	<i>Shigella sonnei</i>													0
	<i>Shigella flexneri</i>													0
	<i>Shigella boydii</i>													0
	<i>Edwardsiella tarda</i>	1	1			1	1			1	1			6
	小計	119	159	199	135	179	200	237	251	261	190	193	212	2,335
	そ の 他	<i>Clostridium difficile</i>		2		1	1	1		2	3		1	3
<i>Candida sp</i>										1				1
他	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	7	6	4	7	10	11	10	7	9	7	4	83
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1			1			2	1			1	6
	<i>Streptococcus group A</i>												1	1
	合計	120	169	205	140	188	211	248	265	273	199	201	221	2,440
vero toxin陽性検体数				1	1			6	5	6	2			21

表 2 . 全国における電話住民調査の結果（2009 年冬、2014 年夏、2016 年夏）
 と宮城県における電話住民調査の結果（2006 年冬および 2007 年夏）
 （全て人口年齢分布補正前のデータ）

	2009年冬(全国)	2014年夏(全国)	2016年夏(全国)
合計コール数	12,265件	13,396件	22,682件
有効コール数 (有効回答率)	2,077件(16.9%)	2,039件(15.2%)	3,020件(13.3%)
有症者数(有病率)	77人(3.7%)	90人(4.4%)	96人(3.2%)
医療機関受診者数 (受診率)	23人(29.9%)	17人(18.9%)	17人(17.7%)
検便実施者数 (検便実施率)	2人(8.7%)	0人(-)	2人(11.8%)

	2006年冬(宮城県)	2007年夏(宮城県)
合計コール数	10,021件	11,965件
有効コール数 (有効回答率)	2,126件(21.2%)	2,121件(17.7%)
有症者数(有病率)	70人(3.3%)	74人(3.5%)
医療機関受診者数 (受診率)	27人(38.6%)	23人(31.1%)
検便実施者数 (検便実施率)	4人(14.8%)	2人(8.0%)

表3 . 宮城県における食品由来下痢症疾患の患者数推定結果とその食中毒患者報告数との比較 (2005~2016年、シミュレーション試行回数：1万回、宮城県人口:236万人)

検出菌	年	¹ 検出数	推定患者数(宮城県) [平均値]	推定患者数(宮城県) [10万人あたり]	² 推定食品由来 患者数(宮城県)	³ 食中毒患者 報告数(宮城県)
カンピロバクター	2005	562	37,019	1,569	29,615	143
	2006	550	36,238	1,536	28,990	109
	2007	538	35,437	1,502	28,350	32
	2008	468	30,786	1,305	24,629	33
	2009	339	26,272	1,113	21,018	9
	2010	354	23,291	987	18,633	25
	2011	324	21,331	904	17,065	9
	2012	262	17,256	731	13,805	52
	2013	226	14,878	630	11,902	8
	2014	252	16,600	703	13,280	32
	2015	271	17,835	755	14,268	5
	2016	282	18,548	786	14,838	7
サルモネラ	2005	78	5,134	218	4,877	12
	2006	46	3,028	128	2,877	11
	2007	46	3,028	128	2,877	25
	2008	56	3,690	156	3,506	0
	2009	33	2,169	92	2,061	23
	2010	51	3,358	142	3,190	13
	2011	23	1,515	64	1,439	0
	2012	30	1,973	84	1,874	12
	2013	33	2,174	92	2,065	0
	2014	43	2,831	120	2,689	0
	2015	41	2,698	114	2,563	0
	2016	42	2,765	117	2,627	0
腸炎ビブリオ	2005	36	2,369	100	1,540	32
	2006	27	1,778	75	1,156	0
	2007	24	1,582	67	1,028	⁴ 627(17)
	2008	8	527	22	343	37
	2009	6	395	17	257	19
	2010	15	988	42	642	16
	2011	7	460	20	299	0
	2012	3	197	8	128	1
	2013	5	329	14	214	0
	2014	4	263	11	171	0
	2015	4	263	11	171	0
	2016	2	132	6	86	0

¹ 宮城県医師会健康センターおよび塩釜医師会臨床検査センターにおける検出数

² 米国での胃腸炎疾患における食品由来感染の割合(カンピロバクター80%、サルモネラ95%、腸炎ビブリオ65%)を用いて算出(Mead et al. 1999)

³ 食中毒患者報告数(宮城県)(厚生労働省食中毒統計、平成17~28年食中毒発生状況)

⁴ 620人は1件のアウトブレイクにおける東日本1都7県での患者を宮城県がとりまとめて報告したもので、2007年の宮城県の実際の腸炎ビブリオ患者報告数は17人である。

表4．宮城県データからの全国の食品由来下痢症患者数の推定とその食中毒患者報告数との比較（2005～2016年、日本全国人口1億2777万人）

検出菌	年	推定食品由来患者数（全国）	食中毒患者報告数（全国）
カンピロバクター	2005	1,603,178	3,439
	2006	1,569,344	2,297
	2007	1,534,698	2,396
	2008	1,333,266	3,071
	2009	1,137,788	2,206
	2010	1,008,678	2,092
	2011	923,796	2,341
	2012	747,320	1,834
	2013	644,303	1,551
	2014	718,899	1,893
	2015	772,384	2,089
	2016	803,240	3,272
サルモネラ	2005	264,011	3,700
	2006	155,743	2,053
	2007	155,743	3,603
	2008	189,794	2,551
	2009	111,570	1,518
	2010	172,687	2,476
	2011	77,899	3,068
	2012	101,447	670
	2013	111,787	861
	2014	145,566	440
	2015	138,745	1,918
	2016	142,210	704
腸炎ピブリオ	2005	83,366	2,301
	2006	62,579	1,236
	2007	55,650	1,278
	2008	18,568	168
	2009	13,912	280
	2010	34,754	579
	2011	16,186	87
	2012	6,929	124
	2013	11,585	164
	2014	9,257	47
	2015	9,257	224
	2016	4,656	240

（宮城県データ：宮城県医師会健康センターおよび塩釜医師会臨床検査センターにおける検出数）

食中毒患者報告数（全国）

（厚生労働省食中毒統計資料、平成17～28年食中毒発生状況）

表5 . 全国を対象とした民間検査機関の住民カバー率の推定 (2006 ~ 2016 年)

年	検査機関住民カバー率(合計)
2006	8.5%(1社)
2007	7.1%(1社)
2008	10.0%(1社)
2009	14.4%(2社)
2010	15.8%(3社)
2011	15.7%(3社)
2012	20.4%(3社)
2013	21.0%(3社)
2014	20.9%(3社)
2015	19.7%(3社)
2016	19.1%(3社)

2010年以降は3社

表6．全国についてのアクティブサーベイランスデータからの全国の実患者数推定とその食中毒患者報告数との比較（2006～2016年、シミュレーション試行回数：1万回、日本全国人口1億2777万人）

検出菌	年	¹ 検出数	推定患者数(全国) [平均値]	推定患者数 (10万人あたり)	² 推定食品由来患者数(全国)	推定食品由来患者 数(10万人あたり)	³ 食中毒患者 報告数(全国)
カンピロバクター	2006	10,144	13,084,001	10,262	10,467,201	8,210	2,297
	2007	10,962	16,939,998	13,286	13,551,998	10,629	2,396
	2008	12,934	14,198,429	11,136	11,358,743	8,909	3,071
	2009	14,057	10,707,971	8,398	8,566,377	6,719	2,206
	2010	15,401	10,687,320	8,382	8,549,856	6,706	2,092
	2011	14,950	10,443,399	8,191	8,354,719	6,553	2,341
	2012	12,794	6,880,816	5,397	5,504,652	4,317	1,834
	2013	13,947	7,286,661	5,715	5,829,329	4,572	1,551
	2014	16,762	8,796,321	6,899	7,037,057	5,519	1,893
	2015	18,164	10,108,930	7,929	8,087,144	6,343	2,089
2016	18,547	10,641,732	8,347	8,513,386	6,677	3,272	
サルモネラ	2006	1,888	2,435,193	1,910	2,313,433	1,815	2,053
	2007	1,886	2,914,508	2,286	2,768,783	2,172	3,603
	2008	1,894	2,079,158	1,631	1,975,200	1,549	2,551
	2009	2,059	1,568,451	1,230	1,490,028	1,169	1,518
	2010	2,434	1,689,042	1,325	1,604,590	1,259	2,476
	2011	2,705	1,889,592	1,482	1,795,112	1,408	3,068
	2012	2,258	1,212,503	951	1,151,878	903	670
	2013	2,324	1,213,198	952	1,152,538	904	861
	2014	2,726	1,430,543	1,122	1,359,046	1,066	440
	2015	2,728	1,518,232	1,191	1,442,320	1,131	1,918
2016	2,689	1,542,870	1,210	1,465,727	1,150	704	
腸炎ピブリオ	2006	523	674,579	529	438,477	344	1,236
	2007	421	650,587	510	422,882	332	1,278
	2008	216	237,116	186	154,126	121	168
	2009	227	172,918	136	112,397	88	280
	2010	563	390,686	306	253,946	199	579
	2011	351	245,193	192	159,375	125	87
	2012	312	167,799	132	109,069	86	124
	2013	287	149,944	118	97,464	76	164
	2014	209	109,678	86	71,291	56	47
	2015	138	76,802	60	49,921	39	224
2016	232	133,115	104	86,525	68	240	

¹ 菌検出数：下記の民間検査機関の検出データを合計した。

2010～2016年：3社（株式会社ミロクメディカルラボラトリー、株式会社ビー・エム・エル、株式会社LSIメディエンス）

2009年：2社（株式会社ビー・エム・エル、株式会社LSIメディエンス）

2006～2008年：1社（株式会社ビー・エム・エル）

² 米国の胃腸炎疾患における食品由来感染の割合（カンピロバクター80%、サルモネラ95%、腸炎ピブリオ65%）を用いて算出（Mead et al. 1999）

³ 食中毒患者報告数（全国）（厚生労働省食中毒統計、平成18～28年食中毒発生状況）

表7．宮城県および全国についてのアクティブサーベイランスデータからの全国の食品由来下痢症患者数の推定の相互比較（2006～2016年、シミュレーション試行回数：1万回）

検出菌	年	宮城県データからの推定 【平均値】	全国データからの推定 【平均値】	食中毒患者報告数 (全国)
カンピロバクター	2006	1,569,344	10,467,201	2,297
	2007	1,534,698	13,551,998	2,396
	2008	1,333,266	11,358,743	3,071
	2009	1,137,788	8,566,377	2,206
	2010	1,008,678	8,549,856	2,092
	2011	923,796	8,354,719	2,341
	2012	787,320	5,504,652	1,834
	2013	644,303	5,829,329	1,551
	2014	718,899	7,037,057	1,893
	2015	772,384	8,087,144	2,089
	2016	803,240	8,513,386	3,272
サルモネラ	2006	155,743	2,313,433	2,053
	2007	155,743	2,768,783	3,603
	2008	189,794	1,975,200	2,551
	2009	111,570	1,490,028	1,518
	2010	172,687	1,604,590	2,476
	2011	77,899	1,795,112	3,068
	2012	101,447	1,151,878	670
	2013	111,787	1,152,538	861
	2014	145,566	1,359,046	440
	2015	138,745	1,442,320	1,918
	2016	142,210	1,465,727	704
腸炎ピブリオ	2006	62,579	438,477	1,236
	2007	55,650	422,882	1,278
	2008	18,568	154,126	168
	2009	13,912	112,397	280
	2010	34,754	253,946	579
	2011	16,186	159,375	87
	2012	6,929	109,069	124
	2013	11,585	97,464	164
	2014	9,257	71,291	47
	2015	9,257	49,921	224
	2016	4,656	86,525	240

・宮城県データ（2006～2016年）：

宮城県医師会健康センターおよび塩釜医師会臨床検査センターにおける検出数

・全国データ：

2010～2016年：3社（株式会社ミロクメディカルラボラトリー、株式会社ビー・エム・エル、株式会社LSIメディエンス）

2009年：2社（株式会社ビー・エム・エル、株式会社LSIメディエンス）

2006～2008年：1社（株式会社ビー・エム・エル）

食中毒患者報告数（全国）（厚生労働省食中毒統計、平成18～28年食中毒発生状況）

図 1 : 2009 年冬期、2014 年夏期、2016 年夏期の電話調査結果の統合データから推定した医療機関受診率（試行 1 万回）

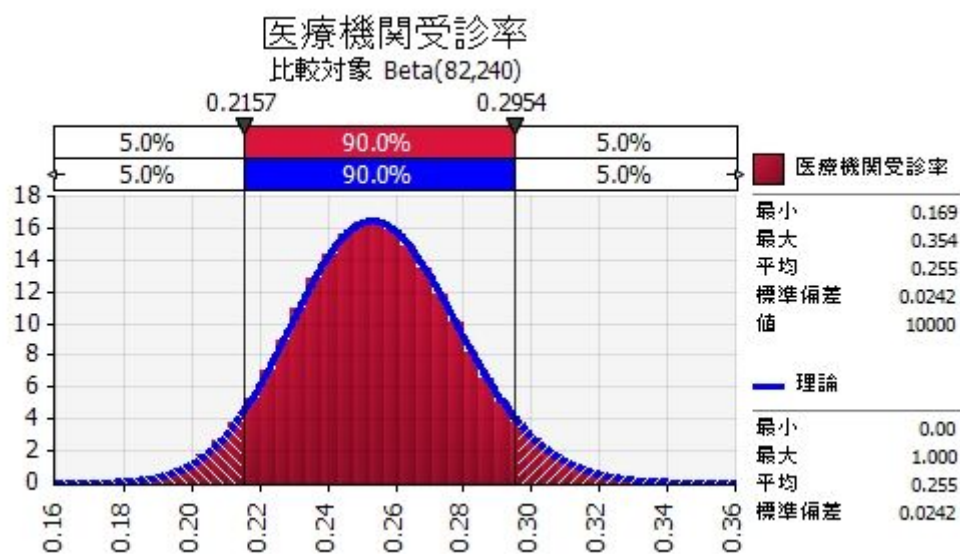


図 2 : 2009 年冬期、2014 年夏期、2016 年夏期の電話調査結果の統合データから推定した検便検査実施率（試行 1 万回）

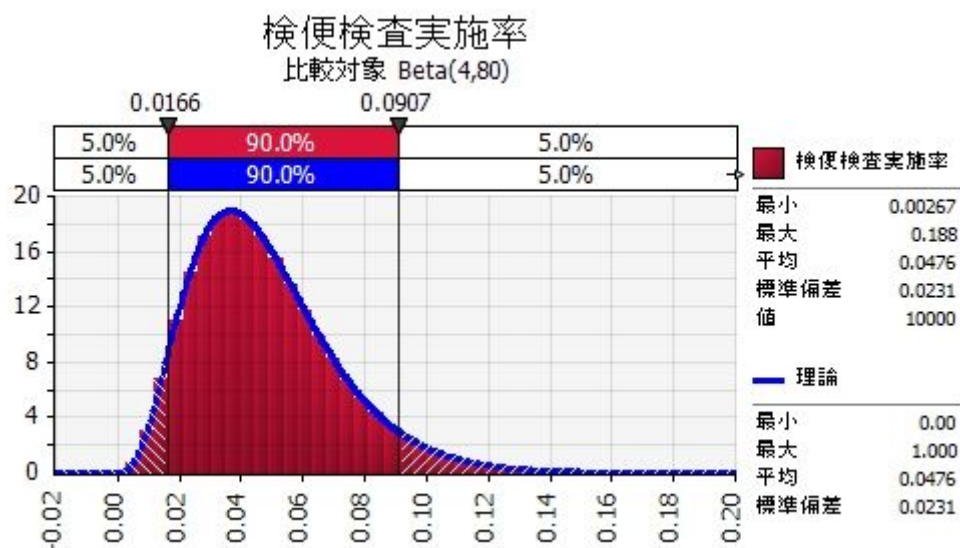
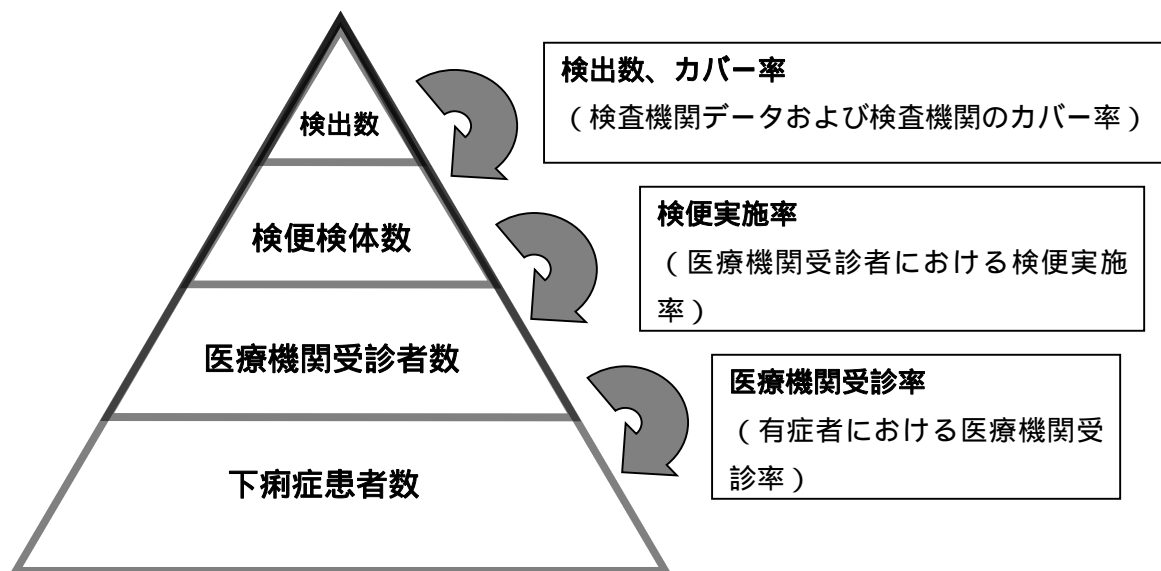


図3 . 下痢症疾患の実患者数の把握

(各段階における不確定要素を検討、積算することで検出数から実被害推定を行う)



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	カンピロバクター食中毒	公衆衛生	81	470-475	2017

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
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.	Poultry Sci.	96	931-937.	2017
Asakura H, Takahashi N, Yamamoto S, Maruyama H.	Draft genome sequence of <i>Campylobacter jejuni</i> CAM970 and <i>C. coli</i> CAM962, associated with a large outbreak of foodborne illness in Fukuoka, Japan, in 2016.	Genome Announc.	5	e00508-17	2017
Asakura H, Yamamoto S, Momose Y, Kato H, Iwaki M, Shibayama K.	Genome Sequence of <i>Clostridium botulinum</i> strain Adk2012 associated with a foodborne botulinum case in Tottori, Japan, in 2012.	Genome Announc.	5	e00872-17	2017

Effect of climatic elements on *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared in southern Japan from 2008 to 2012

K. Ishihara,^{*,†} T. Chuma,^{‡,1} M. Andoh,[‡] M. Yamashita,^{*,†} H. Asakura,[§] and S. Yamamoto^{§, #}

^{*}Women's Future Developing Organization, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo, Japan; [†]Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo, Japan; [‡]Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, Japan; [§]National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, Japan; and [#]School of Marine Science and Technology, Tokai University, 3-20-1 Orido, Shimizu-ku, Shizuoka, Japan

ABSTRACT To demonstrate the effect of climatic elements on *Campylobacter* colonization in broiler chickens reared in Japan, the correlation between *Campylobacter* isolated from chickens (191 of 236 flocks, 80.9%) between 2008 and 2012 and climatic elements was analyzed by logistic regression. We divided the rearing process into 13 terms of 5 d each (total: 65 d). Terms were numbered backwards, wherein a 0-term lag was considered as the sampling day plus 4 d before sampling; 1-term lag was the 5-d term before the 0-term lag, and so on, until the 12-term lag. We obtained climatic data tracing back from the 0-term to the 12-term lags. For evaluation in each season, we divided chickens reared during periods of rising temperature (spring, summer) and decreasing temperature (autumn, winter). Air temperature showed a positive correlation with *Campylobacter* colonization from the 0- to 12-term lags in chickens reared during the period of rising temperature (odds ratio [OR], 1.069 to 1.104), and from the 0- to 4- and 6-term lags (OR, 1.079 to 1.105) in chickens reared during the period of decreasing

temperature. The strong positive effect of air temperature on *Campylobacter* colonization, particularly during the period of rising temperature, may be associated with the effect on the *Campylobacter* environmental sources and/or vectors. A positive correlation was observed between *Campylobacter* colonization and humidity when chicken houses were empty and new chicks were introduced (from the 9- to 12-term lags) during the period of decreasing temperature (OR, 1.076 to 1.141). Thus, high humidity would be an important factor causing carry-over of *Campylobacter* infection during the period of decreasing temperature. We also found that solar radiation increased *Campylobacter* colonization during the period of decreasing temperature, from the 2- to 8-term lags, except for the 4- and 5-term lags, in Japan. The results of this study demonstrate the effects of air temperature, humidity, and solar radiation on *Campylobacter* colonization in broiler chickens, and are potentially important for developing strategies to reduce the risk of *Campylobacter* contamination in broiler chickens.

Key words: broiler chicken, *Campylobacter*, climate, temperature, humidity

2017 Poultry Science 96:931–937
<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew354>

Highlights

- High temperature was suggested to increase *Campylobacter* colonization, especially in warmer seasons.
- Higher humidity would increase carry-over of *Campylobacter* infection in autumn.

INTRODUCTION

Campylobacter spp. are the major causative agents of bacterial diarrheal infection in humans. The high number of campylobacteriosis cases in Japan makes this

pathogen one of the 2 major causes of foodborne illness every year since 2000 (Infectious Agents Surveillance Report, 2010). Most cases of campylobacteriosis are sporadic, and the consumption of poultry products has been identified as a risk factor (Vellinga and Loock, 2002; Domingues et al., 2012). One approach for preventing campylobacteriosis is to reduce the risk of contamination of chicken carcasses with enterobacteria, including *Campylobacter* and other pathogens, during processing. Another strategy is to rear broiler chickens in such a way as to prevent colonization by *Campylobacter*. Therefore, it is crucial to identify both the risk factors and the protective factors involved in colonization of broiler chickens by *Campylobacter*.

A previous study reported that broiler chicken production in western Japan faced a higher risk (odds ratio [OR], 2.68) of *Campylobacter* colonization than that

© 2016 Poultry Science Association Inc.
Received March 30, 2016.
Accepted September 1, 2016.

¹Corresponding author: chuma@vet.kagoshima-u.ac.jp

in eastern Japan (Sasaki et al., 2011). Approximately 300 million broiler chickens were reared in the Kyushu region (western Japan) in 2013, constituting almost 50% of all broiler chickens reared in Japan that year (E-Stat, 2013). Variations among regions, with respect to the percentage of *Campylobacter*-contaminated retail broiler meat products, have also been reported in the United States (Williams and Oyarzabal, 2012).

In our previous study, the extent of contamination of chicken products (meat, skin, and liver) by *Campylobacter* was found to be influenced by air temperature, humidity, and sunshine duration during chicken rearing, suggesting that the environmental conditions observed in broiler farms are correlated with the rate of *Campylobacter* colonization in broiler flocks (Ishihara et al., 2012). Other studies have corroborated these findings, highlighting air temperature, humidity, and sunlight as the main factors affecting *Campylobacter* colonization in broiler flocks (Patrick et al., 2004; Jore et al., 2010).

In the present study, we decided to investigate the effect of climatic elements on *Campylobacter* colonization in chickens. For the purpose, we isolated *Campylobacter* from chicken cecal samples at a slaughterhouse.

MATERIAL AND METHODS

Sample Collection and Farm Information

From January 2008 to December 2012, samples of cecal contents were collected from broiler chickens (~50 d old) at a slaughterhouse in Kagoshima prefecture. Kagoshima is a leading producer of broiler chickens. Sample collection was performed systematically at 14-d intervals throughout the study period. We collected 3,776 cecal samples from 236 broiler flocks that were reared on 121 farms over 5 years. At each sampling day, we selected 2 flocks with the largest number of chickens (~10,000 birds). These 2 flocks were reared on different farms. From each flock, we collected 16 cecal samples. Ninety-one farms were sampled once or twice, 25 farms were sampled 3 or 4 times, and in 5 farms, samples were collected 5 to 7 times (average 1.9 flocks per farm during the 5 yr of investigation).

All broiler flocks were reared in open-sided chicken houses under standard hygiene control procedures. All farms included in the study were located within the Kagoshima prefecture. Although the management of rearing broiler chickens was under the direction of each farm, consistency in practices was confirmed. The size of chicken houses, ventilation system, rearing of chicks, feed, vaccination programs, and hygiene control procedures were generally consistent between farms.

Campylobacter Isolation and Identification

Cecal samples were inoculated into Preston enrichment broth (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) supplemented with 5% lysed horse blood, and were incubated

in a micro-aerobic atmosphere at 42°C for 48 hours. Enrichment cultures were streaked onto Butzler agar plates (Oxoid Ltd.). Suspected *Campylobacter* colonies were picked and sub-cultured on blood agar medium. These isolates were tested using Gram staining and catalase and oxidase production tests. One isolate from each cecal sample was identified by PCR (Chuma et al., 1997), using the strains *Campylobacter jejuni* ATCC 33560^T and *Campylobacter coli* ATCC 33559^T as positive controls.

Climate Data

Climatic data at Kagoshima city (N31° 33.3'; E130° 32.8'), which is the prefectural capital, were obtained from the Japan Meteorological Agency (<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>), who has published climatic data in terms of daily values and as normal values for 10-d periods, from 1981 to 2010. Climatic data included air temperature (°C), relative humidity (%), solar radiation (MJ/m²), and rainfall (mm).

A 5-d period was defined as one term. The first term includes the day when each sample was collected; however, as we were exploring the potential factors of climate influencing the sample infections, we required information on periods before our sampling. Thus, the terms were numbered backwards beginning from the sampling term, expressed as -term lag. In other words, the 0-term lag is constituted by the sampling day plus 4 d before sampling; 1-term lag represents the term (5-d period) before the 0-term lag, and so on until the 12-term lag, which corresponds to 65 d before sampling.

We analyzed the effect of climatic elements on *Campylobacter* colonization, considering the 65 d before cecal sampling. We calculated mean values of air temperature, humidity, and solar radiation, and the total amount of rainfall for each of the 13 terms from the daily climatic data published by the Japan Meteorological Agency. These climatic data obtained from periods before sampling (i.e., data for the lag terms) were used to analyze any potential lagged effects. In Japan, the average age of a broiler flock at shipment time is 54 d (range 46 to 73 d) (Sasaki et al., 2011); therefore, these 13 terms (from 0- to 12-term lags; 65 d) corresponded to the feeding period (0- to 10-term lags), and the interval between the 2 production cycles, when chicken houses were empty (11- and 12-term lags).

To evaluate climatic effect in each season, chickens reared during periods of rising and decreasing temperature were divided for analysis according to our previous report (Ishihara et al., 2012). Periods of rising and decreasing temperature were determined by differences (positive or negative) in air temperature between the 0- and 12-term lags.

Statistical Analysis

If *C. jejuni* or *C. coli* was isolated from at least one chicken from a flock, the flock was determined as *Campylobacter*-positive. For univariate analysis, the correlation between *Campylobacter* colonization from each flock (*Campylobacter* flock status; positive or negative) and climatic data for the 0- to 12-term lags was analyzed by logistic regression analysis, using the forced entry method.

To select the variable for multivariate analyses, the correlation between 2 climatic sets of data at 0-term lag was confirmed by all possible regression. An absolute value of Pearson's correlation coefficient (*r*) of less than 0.3 was considered an appropriate variable for multivariate analyses. Moreover, variance inflation factors were calculated by linear regression to confirm the multicollinearity among climatic data. Variance inflation factors of more than 10 were excluded as a variable for multivariate analyses. A stepwise backward logistic regression analysis (likelihood ratio) was used for the multivariable analysis. Variables with a *P*-value of 0.05 or less in the final model were considered significant. Statistical analyses were performed using the SPSS statistics 23.0 software (IBM Japan Co., Tokyo, Japan).

RESULTS

Climatic Characteristics of Sampling Place

Climatic data of normal values for 10-d periods at Kagoshima city are shown in Figure 1. The climate in

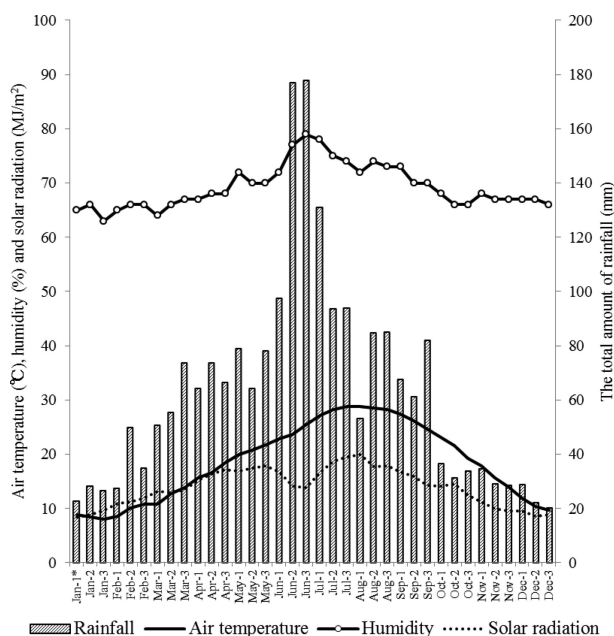


Figure 1. The normal values of climatic data for Kagoshima city, expressed in means (% , °C, MJ/m²) and total amount (mm), per 10-d periods (1980 to 2010). The climatic data were obtained from the Japan Meteorological Agency (<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>). *-1, 1st to 10th; -2, 11th to 20th; -3, 21st to the last day of each month.

Kagoshima is influenced by seasonal winds; therefore, the total amount of rainfall and humidity increases from June to July. In winter, rainfall and humidity decrease. As Kagoshima prefecture is surrounded by the sea, the humidity does not decrease severely.

Isolation of *Campylobacter* spp.

In total, 191 of 236 flocks (80.9%) and 1,987 of 3,776 cecal samples (52.6%) were positive for *Campylobacter* spp. *C. jejuni* and *C. coli* isolates were obtained from 1,761 cecal samples (46.6%; 180 flocks [76.3%]) and 226 cecal samples (6.0%; 40 flocks [16.9%]), respectively. Both *C. jejuni* and *C. coli* were isolated from 29 flocks (12.3%). Eleven flocks (4.7%) were positive for only *C. coli*.

Univariate Analyses

Table 1 shows significantly correlated climatic elements at each term lag. Results also indicate seasonality

Table 1. Univariable analyses of the effect of climatic elements on *Campylobacter* isolation.

Lag term	Variable	Coef.	SE	P	OR	(95% CI)
During the period of rising temperature						
0	Temperature	0.079	0.035	0.024	1.083	(1.011 to 1.160)
1	Temperature	0.080	0.033	0.015	1.083	(1.015 to 1.155)
	Humidity	0.052	0.026	0.043	1.054	(1.002 to 1.108)
2	Temperature	0.099	0.035	0.005	1.104	(1.031 to 1.183)
	Humidity	0.060	0.023	0.010	1.062	(1.015 to 1.112)
3	Temperature	0.093	0.032	0.004	1.098	(1.030 to 1.170)
	Humidity	0.054	0.025	0.031	1.055	(1.005 to 1.108)
	Rainfall	0.024	0.009	0.007	1.024	(1.007 to 1.042)
4	Temperature	0.099	0.033	0.003	1.104	(1.035 to 1.177)
	Humidity	0.084	0.028	0.002	1.087	(1.030 to 1.148)
5	Temperature	0.080	0.033	0.015	1.083	(1.015 to 1.155)
6	Temperature	0.078	0.031	0.013	1.081	(1.017 to 1.150)
7	Temperature	0.088	0.034	0.009	1.092	(1.022 to 1.166)
	Humidity	0.074	0.030	0.014	1.077	(1.015 to 1.143)
8	Temperature	0.067	0.032	0.037	1.069	(1.004 to 1.138)
9	Temperature	0.066	0.032	0.040	1.069	(1.003 to 1.138)
10	Temperature	0.069	0.033	0.040	1.071	(1.003 to 1.144)
	Rainfall	0.020	0.010	0.044	1.020	(1.001 to 1.040)
11	Temperature	0.085	0.035	0.016	1.089	(1.016 to 1.167)
12	Temperature	0.085	0.036	0.019	1.089	(1.014 to 1.169)
	Solar radiation	0.096	0.047	0.043	1.100	(1.003 to 1.207)
During the period of decreasing temperature						
0	Temperature	0.090	0.044	0.041	1.094	(1.004 to 1.193)
1	Temperature	0.099	0.041	0.016	1.105	(1.019 to 1.198)
2	Temperature	0.076	0.038	0.046	1.079	(1.002 to 1.162)
	Solar radiation	0.226	0.099	0.022	1.253	(1.032 to 1.521)
3	Temperature	0.087	0.037	0.020	1.091	(1.014 to 1.173)
	Solar radiation	0.259	0.095	0.007	1.295	(1.075 to 1.562)
4	Temperature	0.077	0.036	0.034	1.080	(1.006 to 1.159)
6	Temperature	0.086	0.035	0.014	1.090	(1.018 to 1.167)
	Solar radiation	0.195	0.078	0.012	1.216	(1.044 to 1.416)
	Rainfall	-0.024	0.010	0.020	0.976	(0.956 to 0.996)
7	Solar radiation	0.196	0.074	0.008	1.217	(1.052 to 1.408)
8	Solar radiation	0.127	0.061	0.036	1.136	(1.008 to 1.280)
9	Humidity	0.132	0.047	0.005	1.141	(1.040 to 1.251)
10	Humidity	0.125	0.041	0.002	1.133	(1.045 to 1.228)
11	Humidity	0.111	0.043	0.010	1.118	(1.027 to 1.216)
12	Humidity	0.073	0.036	0.043	1.076	(1.002 to 1.154)

Temperature, mean of air temperature; Humidity, mean of humidity; Solar radiation, mean of solar radiation; Rainfall, total amount of rainfall; Coef., coefficient; SE, standard error; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

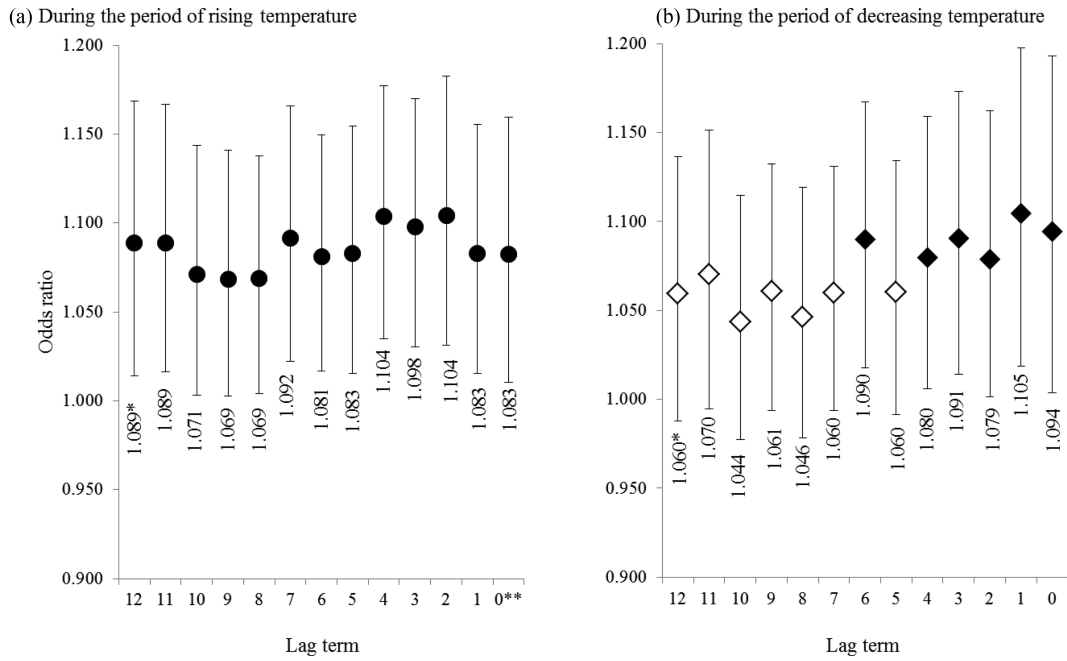


Figure 2. The effects of air temperature ($^{\circ}\text{C}$) on *Campylobacter* colonization. 95% confidence interval of odds ratio is shown by error bar; *odds ratio; **it represents the period just before sampling; filled circle and filled diamond shape, $P < 0.05$.

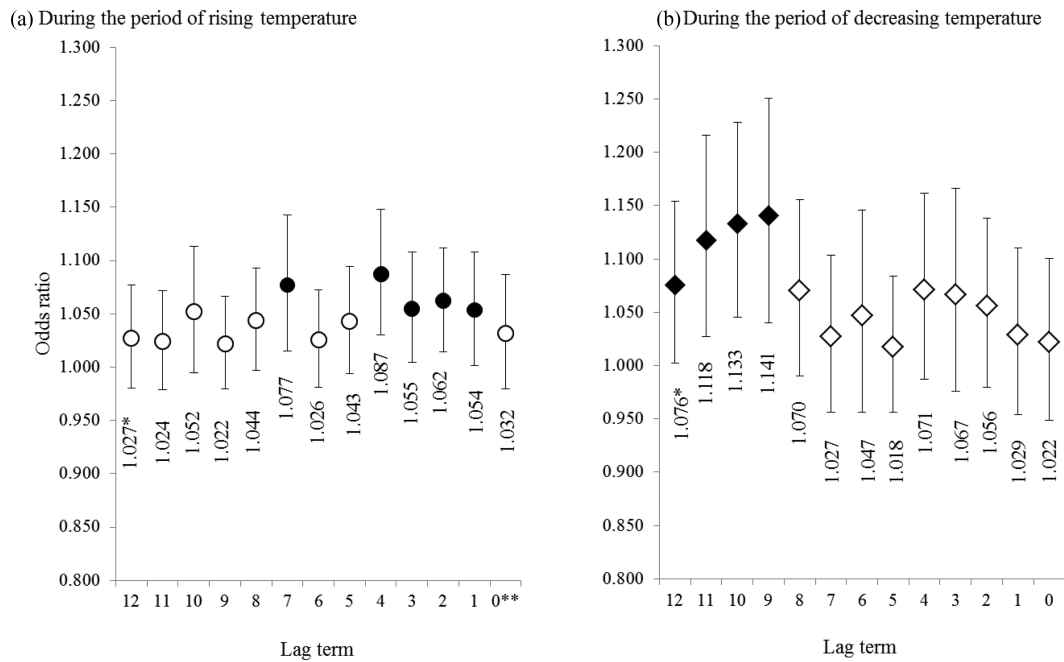


Figure 3. The effects of relative humidity (%) on *Campylobacter* colonization. 95% confidence interval of odds ratio is shown by error bar; *odds ratio; **it represents the period just before sampling; filled circle and filled diamond shape, $P < 0.05$.

(i.e., if reared during periods of rising or decreasing temperatures). Air temperature showed a positive correlation with *Campylobacter* colonization from the 0- to 12-term lags, without observable influence of the periods of rising temperature (OR, 1.069 to 1.104). In chickens reared during the period of decreasing temperature, a positive correlation of air temperature with *Campylobacter* colonization was observed from the 0- to 4- and 6-term lags (OR, 1.079 to 1.105) (Table 1 and

Figure 2). A positive correlation was observed between *Campylobacter* colonization and humidity during periods of rising temperature from the 1- to 4-term lags, and in the 7-term lag (OR, 1.054 to 1.087), and from the 9- to 12-term lags for decreasing temperature periods (OR, 1.076 to 1.141) (Table 1 and Figure 3). During the period of decreasing temperature, solar radiation showed a positive correlation with *Campylobacter* colonization from the 2- to 8-term lags (OR, 1.136 to

1.295), except in the 4- and 5-term lags. However, solar radiation showed a positive correlation only at the 12-term lag for rising temperature conditions (OR, 1.100) (Table 1). During periods of rising temperature, the correlation between total amount of rainfall and *Campylobacter* colonization at the 3- and 10-term lags was positive (OR, 1.024 and 1.020, respectively); however, a significant negative correlation with the amount of rainfall (OR, 0.976) was observed only at the 6-term lag during periods of decreasing temperature (Table 1). In summary, air temperature and humidity showed a positive correlation with *Campylobacter* colonization at the same terms (1- to 4- term lags, and 7-term lag), during periods of rising temperature, but not during periods of decreasing temperature. Air temperature and solar radiation showed a positive correlation with *Campylobacter* colonization at the 2-, 3-, and 6-term lags, during periods of decreasing temperature.

Multivariate Analyses

To select the variables for multivariate analyses, the potential correlation between each pair of climatic data variables was assessed. Mean air temperature and total amount of rainfall were the only paired variables that showed independency (i.e., were not correlated), regardless of season ($r < 0.3$). Even without multicollinearity, we carried out the multivariate analyses. In the multivariate analysis, we included the variables that presented P -values < 0.1 in the univariate analysis. However, the adjusted ORs obtained in the multivariate analysis were equivalent to the ORs obtained in the univariate analysis. Therefore, the results of the multivariate analysis are not shown.

DISCUSSION

Based on univariable logistic regression analyses, air temperature, humidity, and solar radiation were found to have a significant effect on *Campylobacter* colonization in broiler chickens. In particular, air temperature was consistently correlated with *Campylobacter* colonization in chickens reared during the period of rising temperature. In European countries, a strong positive correlation has been reported between mean air temperature and the incidence of *Campylobacter* in broilers (Jore et al., 2010). In the present study, we analyzed the effects of climatic elements on *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Strict temperature control must be performed in broiler houses, depending on the age of chickens. Therefore, air temperature outside broiler houses might affect the environmental sources and/or vectors of *Campylobacter*. Broiler chicken houses are more ventilated during warmer seasons, increasing the chances of contact between susceptible chickens and external or environmental sources of the pathogen (Newell and Fearnley, 2003). A previous study reported that

proximity to cattle increased the risk of *Campylobacter* colonization in broiler chickens (Ellis-Iversen et al., 2009). Another study revealed that *Campylobacter* increased during spring and autumn in dairy cattle (Stanley et al., 1998); in broilers, *Campylobacter* also tended to increase in spring. Thus, broilers also would increase their infection in spring, because of an increase in the infection source. In addition, flies are known to act as vectors in the transmission of *Campylobacter* (Hald et al., 2007). In this context, Guerin et al. (2008) reported that temperature-related variables, which were very important determinants of flies' activity, might be valuable in predicting the risk of *Campylobacter* colonization of broiler chickens.

In chickens reared during periods of rising temperature, a significant correlation between air temperature and *Campylobacter* colonization was observed for the 13 consecutive terms (65 d). The same correlation was detected in chickens reared during periods of decreasing temperature, but only in 6 terms, not during the 13 terms detected during rising temperature terms. In a previous study, air temperature was suggested to have a lesser effect on *Campylobacter* prevalence among broiler chickens during colder months than during warmer months (Patrick et al., 2004). Moreover, air temperature was thought to be associated with the production of *Campylobacter*-contaminated chickens only during the period of rising temperature, but not during the period of decreasing temperature in Japan (Ishihara et al., 2012). Therefore, *Campylobacter* colonization in broiler chickens was thought to increase along with air temperature during warmer seasons, which correspond to the periods of rising temperature in the present study.

From the 9- to 12-term lags, the effect of air temperature on *Campylobacter* colonization was not observed in broiler chickens reared during the period of decreasing temperature; thus, humidity was identified as a risk factor. Moreover, high humidity increased *Campylobacter* colonization between the 1- and 4-term lags, and in the 7-term lag in broiler chickens reared during the period of rising temperature. Since *Campylobacter* cannot survive in dry conditions, higher humidity would increase its prevalence near broiler houses. Depending on the season, the lag term when humidity was associated with *Campylobacter* colonization differed. Air temperature was relatively high during the period in which there was a significant correlation between humidity and *Campylobacter* colonization, independent of the season.

Previous studies have highlighted the previous presence of a *Campylobacter*-positive flock on the farm as a risk factor (Chowdhury et al., 2012; Sandberg et al., 2015). Our previous study also reported that carry-over of *Campylobacter* infection is thought to occur among chicken flocks on the same farm (Ishihara et al., 2006). In summer (the period of rising temperature in the present study), *Campylobacter* colonized more broiler chicken flocks, owing to the higher air temperature.

Thus, carry-over of *Campylobacter* infection would be a more relevant factor in autumn (period of decreasing temperature). Therefore, high humidity is potentially an important factor causing carry-over of *Campylobacter* infection during decreasing temperature periods, when the chicken houses are empty (corresponding to the 11- and 12-term lags), and rearing of chicks has begun (corresponding to the 10- and 9-term lags). Previous studies have demonstrated that humidity is important for the transmission of *Campylobacter* from spent litter to chickens; in fact, a delay in *Campylobacter* colonization was observed under conditions of low humidity (approximately 30%) (Line, 2006).

We found that high levels of solar radiation increased *Campylobacter* colonization in chickens reared during the period of decreasing temperature, although the effect was observed intermittently. Air temperature is determined mainly by solar radiation; therefore, solar radiation is highly correlated with air temperature, which was a risk factor for the *Campylobacter* colonization of chickens. However, the number of terms in which the effect of solar radiation was observed was smaller than those in which the effect of air temperature was observed. Since sunlight was reported to inactivate *Campylobacter* in surface water (Rodriguez and Araujo, 2012), solar radiation was thought to reduce *Campylobacter* colonization through a decrease in the infection source. However, we did not observe this reducing effect of solar radiation. We could not conduct the multivariate analyses, because we detected a correlation between air temperature and solar radiation. Therefore, we could not confirm an independent effect of solar radiation on *Campylobacter* colonization. In fact, the inhibitory effect of solar radiation on *Campylobacter* might be reversed by high air temperature, which was found to increase *Campylobacter* colonization.

In summary, the results of our study suggest that high air temperature and humidity promote *Campylobacter* colonization in broiler chickens in Japan. In chickens reared during periods of rising temperature, high air temperature increased *Campylobacter* colonization, irrespective of the age of the chickens. In chickens reared during the period of decreasing temperature, air temperature was a significant risk factor for older chickens, which were approaching the time of shipping and processing. The high humidity at the time when chicken houses were empty and chicks were younger also increased *Campylobacter* colonization in chickens reared during periods of decreasing temperature. In fact, humidity was suggested to be an important factor causing the carry-over of *Campylobacter* infection.

In conclusion, the present study, carried out in Kagoshima, which is a major producer of broiler chickens of Japan, demonstrated that the effects of climatic elements on *Campylobacter* colonization in chickens depend on the season and the age of chickens. To develop efficient strategies for preventing *Campylobacter* colonization, further studies are required to identify the source of infection, potential reservoirs, and vectors for

transmission of *Campylobacter*, which in turn could be associated with climatic elements.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (H27-shokuhin-ippan-010).

REFERENCES

- Chowdhury, S., M. Sandberg, G. E. Themudo, and A. K. Ersboll. 2012. Risk factors for *Campylobacter* infection in Danish broiler chickens. *Poult. Sci.* 91:2701–2709.
- Chuma, T., K. Yano, H. Omori, K. Okamoto, and H. Yugi. 1997. Direct detection of *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents by PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 59:85–87.
- Domingues, A. R., S. M. Pires, T. Halasa, and T. Hald. 2012. Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol. Infect.* 140:970–981.
- Ellis-Iversen, J., F. Jorgensen, S. Bull, L. Powell, A. J. Cook, and T. J. Humphrey. 2009. Risk factors for *Campylobacter* colonisation during rearing of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 89:178–184.
- E-Stat. 2013. Ministry of Internal Affairs and Communications, Statistics Bureau, Japan. Accessed 2nd Feb, 2016. <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/eStatTopPortal.do>.
- Guerin, M. T., S. W. Martin, J. Reiersen, O. Berke, S. A. McEwen, V. Fridriksdottir, J. R. Bisaiillon, and R. Lowman. 2008. Temperature-related risk factors associated with the colonization of broiler-chicken flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001–2004. *Prev. Vet. Med.* 86:14–29.
- Hald, B., H. M. Sommer, and H. Skovgard. 2007. Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1951–1953.
- Infectious Agents Surveillance Report. 2010. *Campylobacter* enteritis in Japan, 2006–2009. 31:1–18.
- Ishihara, K., R. Takahashi, M. Andoh, K. Makita, S. Kamiji, H. Ueno, Y. Muramatsu, and Y. Tamura. 2012. Effects of climatic elements on *Campylobacter*-contaminated chicken products in Japan. *Epidemiol. Infect.* 140:991–996.
- Ishihara, K., S. Yano, M. Nishimura, T. Asai, A. Kojima, T. Takahashi, and Y. Tamura. 2006. The dynamics of antimicrobial-resistant *Campylobacter jejuni* on Japanese broiler farms. *J. Vet. Med. Sci.* 68:515–518.
- Jore, S., H. Viljugrein, E. Brun, B. T. Heier, B. Borck, S. Ethelberg, M. Hakkinen, M. Kuusi, J. Reiersen, I. Hansson, E. O. Engvall, M. Lofdahl, J. A. Wagenaar, W. van Pelt, and M. Hofshagen. 2010. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997–2007. *Prev. Vet. Med.* 93:33–41.
- Line, J. E. 2006. Influence of relative humidity on transmission of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poult. Sci.* 85:1145–1150.
- Newell, D. G., and C. Fearnly. 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4343–4351.
- Patrick, M. E., L. E. Christiansen, M. Waino, S. Ethelberg, H. Madsen, and H. C. Wegener. 2004. Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. in humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7474–7480.
- Rodriguez, S., and R. Araujo. 2012. Effect of environmental parameters on the inactivation of the waterborne pathogen *Campylobacter* in a Mediterranean river. *J. Water Health.* 10:100–107.
- Sandberg, M., L. L. Sorensen, B. Steenberg, S. Chowdhury, A. K. Ersboll, and L. Alban. 2015. Risk factors for *Campylobacter* colonization in Danish broiler flocks, 2010 to 2011. *Poult. Sci.* 94:447–453.
- Sasaki, Y., Y. Tsujiyama, H. Tanaka, S. Yoshida, T. Goshima, K. Oshima, S. Katayama, and Y. Yamada. 2011. Risk Factors for

- Campylobacter* colonization in broiler flocks in Japan. Zoonoses Public Health. 58:350–356.
- Stanley, K. N., J. S. Wallace, J. E. Currie, P. J. Diggle, and K. Jones. 1998. The seasonal variation of thermophilic campylobacters in beef cattle, dairy cattle and calves. J. Appl. Microbiol. 85:472–480.
- Vellinga, A., and F. Van Loock. 2002. The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related campylobacter enteritis. Emerg. Infect. Dis. 8:19–22.
- Williams, A., and O. A. Oyarzabal. 2012. Prevalence of *Campylobacter* spp. in skinless, boneless retail broiler meat from 2005 through 2011 in Alabama, USA. BMC Microbiol. 12:184.



Draft Genome Sequence of *Campylobacter jejuni* CAM970 and *C. coli* CAM962, Associated with a Large Outbreak of Foodborne Illness in Fukuoka, Japan, in 2016

Hiroshi Asakura,^a Naoto Takahashi,^b Shiori Yamamoto,^a Hiroyuki Maruyama^b

Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan^a; Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment, Fukuoka, Japan^b

ABSTRACT Here, we report the draft genome sequences of *Campylobacter jejuni* CAM970 and *C. coli* CAM962, which were associated with a large outbreak of foodborne illness originating from undercooked chicken sushi in Fukuoka, Japan, in May 2016. Their genome sizes were 1,690,901 and 1,704,736 bp, with 22 and 23 rRNAs, 9 and 9 tRNAs, and 411× and 419× coverage for *C. jejuni* CAM970 and *C. coli* CAM962, respectively.

Campylobacter jejuni and *C. coli* are two of the leading causes of foodborne gastrointestinal illnesses, which, worldwide, number approximately 400 to 500 million cases annually (1, 2). In Japan, a total of 339 cases of foodborne campylobacteriosis were reported in 2016, which represented 29.7% of all foodborne cases (1,140 cases) reported that year (3). Epidemiological data have shown that chicken meat is one of the main sources for human campylobacteriosis (4). In May 2016, a large foodborne outbreak caused by *Campylobacter* spp. occurred; 266 patients suffered from gastroenteritis due to the consumption of undercooked chicken meat and vinegar rice (sushi) in Fukuoka city. Bacteriological surveillance determined that both *C. jejuni* and *C. coli* were associated with the outbreak. In order to characterize their genomic traits, we examined, and report here, the draft genome sequences of *C. jejuni* CAM970 and *C. coli* CAM962, which were isolated from patients treated during the outbreak. Genomic DNA of the two strains was sequenced by single-end sequencing with an Ion Torrent PGM sequencer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), resulting in average coverages of 411× and 419×, respectively. Raw reads were trimmed and *de novo* assembled using CLC Genomics Workbench version 9.0 (Qiagen, Hilden, Germany). The parameters for trimming were as follows: ambiguous limit, 2; quality limit, 0.05; number of 5' terminal nucleotides, 20; and number of 3' terminal nucleotides, 5. The parameters for the *de novo* assembly were as follows: mapping mode, create simple contig sequences (fast); bubble size, 50; word size, 21; minimum contig length, 500 bp; perform scaffolding, no; and autodetect paired distances, yes. The draft genomes of *C. jejuni* CAM970 and *C. coli* CAM962 were assembled into 61 and 34 contigs with accumulated lengths of 1,690,901 and 1,704,736 bp (N_{50} , 92,774 and 156,200 bp) and average G+C contents of 30.2 or 31.3%, respectively. The genome was annotated with the RAST server (5). Annotation of these assemblies identified 1,813 and 1,820 coding sequences, 22 and 23 rRNAs, and 9 and 9 tRNAs, for *C. jejuni* CAM970 and *C. coli* CAM962, respectively.

The sequence types (STs) of these strains were also profiled with a multilocus sequence typing (MLST) scheme (6). The results showed that strains CAM970 and CAM962 belonged to ST5716 and ST1181, respectively, and both strains were found to associate with human infection based on the *Campylobacter* MLST database (<https://>

Received 28 April 2017 Accepted 2 May 2017 Published 15 June 2017

Citation Asakura H, Takahashi N, Yamamoto S, Maruyama H. 2017. Draft genome sequence of *Campylobacter jejuni* CAM970 and *C. coli* CAM962, associated with a large outbreak of foodborne illness in Fukuoka, Japan, in 2016. *Genome Announc* 5:e00508-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00508-17>.

Copyright © 2017 Asakura et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Hiroshi Asakura, hasakura@nihs.go.jp.

pubmlst.org/campylobacter). The data provided here can aid in future efforts to identify the sources of infections, since the genome sequence-based framework has potential advantages for epidemiological studies of *Campylobacter* infections (7). With the increased application of whole-genome sequencing technologies to epidemiological studies of *Campylobacter* outbreaks (i.e., source tracking) (8, 9), further accumulation of genomic data of *Campylobacter* spp. associated with foodborne outbreaks will contribute to improving our understanding of host and geographic adaptation of this pathogen and lead to the development of preventive strategies.

Accession number(s). This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession numbers [BDRZ01000000](https://accession.ddbj.go.jp/acc/showacc.cgi?acc=AB010000000) (CAM970) and [BDRY01000000](https://accession.ddbj.go.jp/acc/showacc.cgi?acc=AB010000000) (CAM962). The versions described in this paper are the first versions, [BDRZ01000000](https://accession.ddbj.go.jp/acc/showacc.cgi?acc=AB010000000) (CAM970) and [BDRY01000000](https://accession.ddbj.go.jp/acc/showacc.cgi?acc=AB010000000) (CAM962).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare (no. H27-Shokuhin-Ippan-010) and by a Grant-in-Aid of Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (no. 16K08040).

REFERENCES

1. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. 2015. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev* 28: 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>.
2. Ruiz-Palacios GM. 2007. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clin Infect Dis* 44:701–703. <https://doi.org/10.1086/509936>.
3. Japan Ministry of Health, Labour and Welfare. 2017. Food poisoning statistics report. http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html.
4. Skarp CP, Hänninen ML, Rautelin HI. 2016. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect* 22:103–109. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019>.
5. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
6. Joky KA, Maiden MC. 2010. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 11:595. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>.
7. Llarena AK, Taboada E, Rossi M. 2017. Whole-genome sequencing in the epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *J Clin Microbiol* 55: 1269–1275. <https://doi.org/10.1128/JCM.00017-17>.
8. Lahti E, Löfdahl M, Ågren J, Hansson I, Olsson Engvall E. 2017. Confirmation of a campylobacteriosis outbreak associated with chicken liver pâté using PFGE and WGS. *Zoonoses Public Health* 64:14–20. <https://doi.org/10.1111/zph.12272>.
9. Clark CG, Berry C, Walker M, Petkau A, Barker DO, Guan C, Reimer A, Taboada EN. 2016. Genomic insights from whole genome sequencing of four clonal outbreak *Campylobacter jejuni* assessed within the global *C. jejuni* population. *BMC Genomics* 17:990. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3340-8>.



Genome Sequence of *Clostridium botulinum* Strain Adk2012 Associated with a Foodborne Botulinum Case in Tottori, Japan, in 2012

Hiroshi Asakura,^a Shiori Yamamoto,^a Yoshika Momose,^a Haru Kato,^b Masaaki Iwaki,^b Keigo Shibayama^b

Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan^a; Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan^b

ABSTRACT We report here a draft genome sequence of *Clostridium botulinum* Adk2012 responsible for a foodborne botulism case that occurred in Tottori, Japan, in 2012. Its genome size was 2,904,173 bp, with 46 rRNAs and 54 tRNAs, at a coverage of 14.5×.

Clostridium botulinum is a spore-forming anaerobe with the ability to produce botulinum neurotoxin (BoNT) that causes a neuroparalytic disease, botulism (1, 2). Although the incidence of botulism is not frequent, this pathogen is recognized as one of the most serious biological hazards because of its high mortality rate (3). The most common form in Western countries is infant botulism, while foods also occasionally transmit this pathogen to humans through the ingestion of BoNT generated in the food matrixes. Typically, home-canned food substances and fermented uncooked dishes are thought to be some of the major sources for foodborne botulism (<http://www.cdc.gov/botulism>).

On March 2012, one foodborne botulism case occurred by the intake of contaminated adzuki batto, a sweet adzuki bean soup containing flat wheat noodles in a vacuum package (4). Although the causative *C. botulinum* strain, Adk2012, harbored both *ha33* and *p47* genes, representing the BoNT/A and BoNT/B clusters, respectively (5), only BoNT/A was detected from the causative food at 75,000 50% lethal dose (LD₅₀)/g of weight intraperitoneally (i.p.) in a mouse toxicity assay (4).

To further characterize its genomic trait(s), this study determined a draft genome sequence of the *C. botulinum* Adk2012 strain originating from the causative food of a foodborne botulism case in Japan 2012. The genomic DNA of the strain was extracted using the Genomic tip-500G kit (Qiagen, Hilden, Germany), followed by sequencing analysis using paired-end sequencing with a FLX Titanium sequencer (Roche, Basel, Switzerland), which resulted in an average coverage of 14.5×. Raw reads were trimmed and *de novo* assembled using CLC Genomics Workbench version 9.5 (Qiagen). The parameters for trimming were as follows: ambiguous limit, 2; quality limit, 0.05; number of 5'-terminal nucleotides, 20; and number of 3'-terminal nucleotides, 5. The parameters for *de novo* assembly were as follows: mapping mode, create simple contig sequences (fast); bubble size, 50; word size, 21; minimum contig length, 2,000 bp; perform scaffolding, no; and autodetect paired distances, yes. The draft genome of the *C. botulinum* Adk2012 strain was assembled into 275 contigs, with an accumulated length of 2,904,173 bp (*N*₅₀, 12,881 bp) and an average G+C content of 28.4%. The genome was annotated by the RAST server (6). Annotation of these assemblies identified 3,486 coding sequences (CDSs), 46 rRNAs, and 54 tRNAs.

Received 24 July 2017 Accepted 26 July 2017 Published 24 August 2017

Citation Asakura H, Yamamoto S, Momose Y, Kato H, Iwaki M, Shibayama K. 2017. Genome sequence of *Clostridium botulinum* strain Adk2012 associated with a foodborne botulinum case in Tottori, Japan, in 2012. *Genome Announc* 5:e00872-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00872-17>.

Copyright © 2017 Asakura et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Hiroshi Asakura, hasakura@nihs.go.jp.

The nucleotide sequence of the BoNT/A gene in the Adk2012 strain showed 100% identity to the BoNT/A1 in strain ATCC 3502, while the sequence of BoNT/B1 gene contained stop codons and deletions, indicating its loss of function, which was in agreement with a previous finding by Hutson et al. (7). The SEED Viewer program also showed that the *C. botulinum* A strain ATCC 3502 was one of the closest neighbors to the Adk2012 strain. Considering the genomic diversity of this pathogen (8), further accumulation of genomic data will provide new information on pathogen biology and transmission and inform studies on pathogen evolution.

Accession number(s). This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number [BDQO00000000](https://doi.org/10.1093/nar/bdy000). The version described in this paper is the second version, BDQO02000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported in part by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) (grants H29-Shokuhin-Ippan-006 and H27-Shokuhin-Ippan-010) and a grant-in-aid for scientific research from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) (grant 16K08040).

REFERENCES

1. Peck MW. 2009. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Adv Microb Physiol* 55:183–265, 320. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05503-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05503-9).
2. Lindström M, Korkeala H. 2006. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev* 19:298–314. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.298-314.2006>.
3. Fleming DO. 2000. *Biological safety: principles and practices*. ASM Press, Washington, DC.
4. Momose Y, Asakura H, Kitamura M, Okada Y, Ueda Y, Hanabara Y, Sakamoto T, Matsumura T, Iwaki M, Kato H, Shibayama K, Igimi S. 2014. Food-borne botulism in Japan in March 2012. *Int J Infect Dis* 24:20–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.01.014>.
5. Umeda K, Seto Y, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S. 2010. A novel multiplex PCR method for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A gene cluster typing. *Microbiol Immunol* 54:308–312. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00213.x>.
6. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
7. Hutson RA, Zhou Y, Collins MD, Johnson EA, Hatheway CL, Sugiyama H. 1996. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* type A containing silent type B neurotoxin gene sequences. *J Biol Chem* 271:10786–10792. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10786>.
8. Peck MW, van Vliet AHM. 2016. Impact of *Clostridium botulinum* genomic diversity on food safety. *Curr Opin Food Sci* 10:52–59. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.006>.