

令和5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)
と畜・食鳥処理場における HACCP の検証及び食肉・食鳥肉の衛生管理の向上に資するための研究
分担研究報告書

分担研究項目:食鳥内臓肉における病原微生物の汚染実態把握と汚染低減に向けた研究

分担研究者 中馬猛久

所属 鹿児島大学共同獣医学部

研究要旨

これまで加熱不十分の鶏レバーの喫食による食中毒が散見されてきているが、十分なリスク評価がなされていない。そこで、本研究では食鳥内臓肉における病原微生物の汚染実態を調査し、特にモニタリングすべき対象微生物に検討を加えた。本年度は、鶏レバーを汚染するカンピロバクター属菌の菌数を計測するとともに、サルモネラ属菌汚染実態を調べた。また、鶏レバー内部からはカンピロバクター属菌とサルモネラ属菌のみならず、それ以外の菌の分離同定も試みた。その結果、鶏レバーは55.2%がカンピロバクター属菌陽性を示し菌数が最も高かった検体で 1.3×10^3 cfu/g を示したが、鶏レバー内部に存在するカンピロバクター属菌の菌数は多くはないものと推察された。鶏レバーのサルモネラ属菌陽性率は72.7%と高率を示したが、肝内部からはサルモネラ属菌は分離されず、食鳥肉処理工程における糞便から肝表面への交差汚染の可能性が高いものと思われた。また、レバー内部には一定数のカンピロバクター属菌が存在することが明らかになり、表面を加熱しただけではカンピロバクター属菌症のリスクを完全に取り除くことはできないことが示唆された。さらにレバー内部から *A. hydrophila* や *A. sobria* などの食中毒を引き起こしうる細菌が分離同定されたことから、生食の際にはこれらの細菌による食中毒のリスクも伴うことが明らかになった。

A 研究目的

国内の食鳥処理場では令和3年より「HACCPに基づく衛生管理」が本格施行となり、食鳥と体を対象に、現場検査、微生物試験、並びに記録検査が自治体の食鳥検査員により行われる体制で運用されている。こうした検査体制の確立と維持は我が国における食肉、食鳥肉の安全性確保に不可欠な要素である。我が国には「鶏刺し」のような生食文化が存在し、生食用として供される鶏肉の生産加工にはより一層の衛生管理が必要とされることから、そのための基礎データが収集されてきた。しかしながら、鳥の内臓肉、特に肝臓(レバー)については十分な基礎データが得られておらず、加熱不十分の鶏レバーの喫食による食中毒は制御できていないものと思われる。そこで、本研究では食鳥内臓肉における病原微生物の汚染実態を

調査し、特にモニタリングすべき対象微生物に検討を加える。

本年度は、鶏レバーを汚染するカンピロバクター属菌の菌数を計測するとともに、サルモネラ属菌汚染実態を調べる。また、鶏レバー内部からはカンピロバクター属菌とサルモネラ属菌のみならず、それ以外の菌の分離同定も試みる。

B 研究方法

1、供試材料

2023年7月から2024年3月にかけて7回に分けて鹿児島市内A、B、C、D4ヶ所の大規模小売店で市販されている鶏肝臓38検体を購入した(表1)。

2、カンピロバクター属菌の培養と定量

鶏レバー25gを秤量し225mlのプレストン液体培地(Oxoid, Ltd.)を加えストマッカーで1分間ホモジナイズし検体懸濁液を調整した。その後、同懸濁液10mlを3本作成したほか、同懸濁液1ml、0.1mlをそれぞれ3本ずつプレストン液体培地9ml、9.9mlに接種し、10mlの10倍、100倍希釈液として培養した。その後、培養液より1白金耳をとり、バツラー寒天培地(Oxoid)に画線塗布し培養に供した。バツラー寒天培地上に発育したカンピロバクター属菌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性状を確認した上で、バツラー寒天培地またはMueller-Hinton(MH)寒天培地(Oxoid)に1検体につき1コロニーを画線塗布し、純培養した。一連のカンピロバクター属菌菌分離にあたっての培養はすべて微好気条件下、42°C、48時間で実施した。菌種の同定には、*C. jejuni*の特異的プライマー(VS15/VS16)、*C. coli*の特異的プライマー(CC18F/CC519R)を用いたPCR法により実施した。反応液組成は、計4種のプライマー保存溶液(各2pmol/μl)をそれぞれ2μlずつ、EmeraldAmp PCR Master Mix(TAKARA BIO, Shiga, Japan)10μl、滅菌蒸留水2μlと合わせ、20μl総量とし、これに1白金線量のコロニーを直接添加した後、反応を開始した。陽性コントロールには、*C. jejuni* ATCC 33560株、*C. coli* ATCC 33559株由来DNAを用いた。PCRは、94°C30秒、56°C30秒、72°C30秒の35サイクルで実施した。反応後のPCR産物は、1.5%アガロースゲル(AMRESCO, Ohio, US)で100V、60分電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後に増幅断片の有無及び分子量を確認した。

カンピロバクター属菌陽性試験管の本数を確認し食品衛生検査指針に掲載されたMPN推定表を参照してカンピロバクター属菌数をMPN/10gとして表記した。

同時に平板法での菌数評価も実施した。同じ鶏レバーサンプルを用いて10gを秤量し90mlのチオ硫酸ナトリウム緩衝ペプトン水(BPW-ST)を加え1分間ストマッカー処理を行い平板菌数測定用原液とした。BPW-STで10倍階段希釈し、3段階の希釈液を作成した。原液と各希釈液を各2枚ずつのmCCDAクリア培地にコンラージ棒で50μlずつ接種した後、培養した。発育したカンピロバクター

属菌様コロニーを計数した上でPCRにてカンピロバクター属菌であることを確認した。

3、サルモネラ属菌の検出

5から7回目に購入された鶏レバーを用いてサルモネラ属菌の検出を実施した。レバー10gを秤量し90mlのラパポート培地に接種し42°C24時間増菌培養後、ランバック寒天培地で37°C24時間培養した。サルモネラ属菌と思われるスカーレット色のコロニーを純培養し、クエン酸培地、LIM培地、TSI培地での性状検査により同定し、スライド凝集反応によりO抗原血清型別を行った。

4、レバー内部からの菌分離

鶏レバーを1片シャーレにとり、表面を70%エタノール含有脱脂綿で丁寧に拭き取ったのち、滅菌したメスで分断した。断面を血液寒天培地とバツラー寒天培地にスタンプしたのち血液寒天培地は37°C48時間後期培養、バツラー寒天培地は42°Cで48時間微好気培養後、発育したコロニーを観察し、レバー内部の菌として純培養した。バツラー寒天に発育したカンピロバクター属菌様コロニーは上述のPCRにて同定した。血液寒天培地に発育したコロニーは、形態の異なるものがあればレバー1検体当たり最高3コロニーまで選び純培養し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計(MALDI-TOFMS: ブルカー社)にて同定した。MALDI-TOFMSで同定できなかった菌株は16S rDNAのシーケンスをサンガー法またはナノポア法により解読し同定した。

BLAST解析により配列が最も近かった菌名を記載した。

C. 研究結果

MPN法による鶏レバーのカンピロバクター属菌数推定の際、38検体中22検体(57.9%)が陽性を示し、全検体の42.1%(16/38)が3~1,400 MPN/10g、15.8%(6/38)が1,400 MPN/10gより高い値を示した(表2)。陽性検体から得られた菌株は全て*C. jejuni*であった。店舗ごとでは、A店81.8%(9/11)、B店38.5%(5/13)、C店33.3%(3/9)、D店

100% (5/5)であった。平板法によるカンピロバクター属菌数の計測結果(表3)では、38 検体中 31 検体(81.6%)においてコロニーの発育が認められず、検出限界値である 1.0×10^2 cfu/g 未満と推定された。全検体の 15.8% (6/38) が $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$ cfu/g、2.7% (1/38) が $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ cfu/g を示した。

カンピロバクター属菌数が 1.3×10^3 cfu/g を超える検体は認められなかった。陽性検体から得られた菌株は全て *C. jejuni* であった。

5～7 回目に購入された鶏レバー22 検体でサルモネラ属菌の分離同定を実施した結果、血清型 O4 群が 13 検体、O8 群が 3 検体から分離された(表4)。本調査におけるサルモネラ属菌の陽性率は 72.7%で、既に報告されている全国の汚染実態調査における陽性率よりも高い値を示した。O 抗原血清型は 81.3%が O4、18.7%が O8 と分類された。

鶏レバー内部からカンピロバクター属菌の検出を試みた結果、38 検体中 10 検体(26.3%)から *C. jejuni* が検出された。店舗ごとの陽性率はそれぞれ A 店 27.2% (3/11)、B 店 7.7% (1/13)、C 店 22.2% (2/9)、D 店 80.0% (4/5)であった。

血液寒天を用いてカンピロバクター属菌以外の好気性細菌の分離培養を試みた結果、TOFMS、16S rRNA シークエンスで表6のリストに示した菌が分離された。

Aeromonas 属菌(16 検体)、*Escherichia coli* (4 検体)、*Lactobacillus* 属菌(3 検体)の順に多くの検体から分離された。他の属菌は2もしくは1検体から分離されたのみであったが、*Corynebacterium*、*Proteus*、*Citrobacter*、*Chryseobacterium* 属菌などの多岐にわたる属の菌が肝内部から分離された。

D. 考察

本調査において、汚染菌数が少ない場合に用いられる MPN 法によって、レバーのカンピロバクター属菌陽性率は 55.2%と比較的高い値を示し、検出限界値より高い $1,400$ MPN/10g 以上を示した検体が 6 検体あったことから、鶏レバーの一部は高菌数のカンピロバクター属菌に

汚染されていることが危惧された。しかしながら、同じ検体の平板法による菌数をみると、 1.3×10^3 cfu/g より大きい値を示した検体は認められなかったことから、鶏レバーに存在するカンピロバクター属菌の菌数は多くないと推察される。本研究で評価した鶏レバー数は 38 検体にとどまっている。カンピロバクター属菌の菌数評価には他の菌よりも多くのコスト、時間、労働力を費やすが現実的に食中毒リスクの評価を求めるならばもっと検体数を増やす必要があるものと思われる。

鶏レバー22 検体を用いたサルモネラ属菌汚染調査では、他の調査における鶏盲腸でのサルモネラ属菌検出状況と同様の傾向が認められ、肝のサルモネラ属菌汚染は腸管内保菌と関連があるものと思われる。本調査では肝内部からはサルモネラ属菌は分離されておらず、食鳥肉処理工程における糞便から肝表面への交差汚染の可能性が高いものと思われる。サルモネラ属菌はカンピロバクター属菌と異なり温度管理の不徹底により食肉中で菌数が増加することがあるので、レバーを汚染しているサルモネラ属菌の菌数定量が必要かもしれない。

レバー内部のカンピロバクター属菌数を評価した結果、一定数のカンピロバクター属菌が存在することが明らかになり、レバー表面を加熱しただけではカンピロバクター属菌症のリスクを完全に排除することはできないことが示唆された。また、鶏レバー内部から *A. hydrophila* や *A. sobria* などの食中毒を引き起こしうる細菌が分離同定されたことから、生食の際にはこれらの細菌による食中毒のリスクも伴うことが明らかになった。また、鶏レバー内に様々な環境由来細菌が存在していることも明らかとなった。これらの菌の多くは人体への病原性が未知数であるが、食中毒を防ぐためには鶏レバーの十分な加熱と適切な温度下での保管が重要と言えるだろう。

E. 結論

レバーのサルモネラ属菌陽性率は 72.7%と高い値を示したが、肝内部からサルモネラ属菌は分離されず、食鳥肉処理工程における糞便から肝表面への交差汚染の可能性が高いものと思われた。また、レバー内部には一定

数のカンピロバクター属菌が存在することが明らかになり、表面を加熱しただけではカンピロバクター属菌症のリスクを完全に取り除くことはできないことが示唆された。

さらに、レバー内部から *A. hydrophila* や *A. sobria* などの食中毒を引き起こしうる細菌が分離同定されたことから、生食の際にはこれらの細菌による食中毒のリスクも伴うことが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 17 回日本カンピロバクター属菌研究会総会 2023
年 12 月 1 日 大阪府健康安全研究センター「ブロイラー
から分離された *Campylobacter jejuni* の LOS クラス、GBS
関連遺伝子と MLST 解析」

○宮島里佳, 津留優, 宗安祥佳, 奥谷公亮, Vu Minh Duc,
中馬猛久

G. 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

表 1 調査回数と各店舗から購入したレバー数

回	店舗			
	A	B	C	D
1	—	2	—	2
2	2	2	—	—
3	2	2	2	—
4	1	1	—	—
5	2	2	2	—
6	2	2	2	2
7	2	2	3	1
計	11	13	9	5

表 2 MPN 法によるレバーのカンピロバクター数 (MPN/10g)

回	店舗			
	A	B	C	D
1		>1,400 >1,400		>1,400 36
2	43 23	— —		
3	1,100 15	36 23	93 20	
4	1,100	—		
5	>1,400 460	— —	— —	
6	— —	3 —	1,100 —	>1,400 >1,400
7	460 7	— —	— — —	240

表3 平板法によるレバーのカンピロバクター数 (CFU/g)

回	店舗			
	A	B	C	D
1		6.0 X 10 ² 0		0 0
2	0 0	0 0		
3	1.3 X 10 ³ 0	1.0 X 10 ² 0	0 0	
4	0	0		
5	1.0 X 10 ² 0	0 0	0 0	
6	0 0	0 0	0 0	4.0 X 10 ² 1.0 X 10 ²
7	0 0	0 0	0 0 0	2.0 X 10 ²

表4 レバーから分離されたサルモネラの血清型 (O 抗原型)

回	店舗			
	A	B	C	D
5	04 —	— —	04 08	
6	04 —	04 04	08 —	04 04
7	04 04	04 04	04 08 —	04

表5 レバー内部から分離されたカンピロバクター

回	店舗			
	A	B	C	D
1		<i>C. jejuni</i> —		<i>C. jejuni</i> <i>C. jejuni</i>
2	— —	— —		
3	<i>C. jejuni</i> —	— —	<i>C. jejuni</i> —	
4	—	—		
5	<i>C. jejuni</i> —	— —	— —	
6	— —	— —	<i>C. jejuni</i> —	<i>C. jejuni</i> <i>C. jejuni</i>
7	<i>C. jejuni</i> —	— —	— — —	—

表 6 レバー内部から分離され TOFMS または 16SrDNA シーケンスによって同定された菌のリスト

店舗 A	菌名
TOFMS	<i>Aeromonas eucrenophila</i> <i>Aeromonas media</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Aeromonas sobria</i> <i>Rubrivivax gelatinosus</i> <i>Aeromonas bestiarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
16s rDNA	<i>Gallibacterium genomosp</i> <i>Macrococcus canis</i> <i>Buttiauxella sp</i> <i>Aeromonas encheleia</i>

店舗 B	菌名
TOFMS	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Citrobacter braakii</i> <i>Aeromonas media</i> <i>Aeromonas encheleia</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas bestiarum</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Candida valida</i> <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Acinetobacter parvus</i>
16s rDNA	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Glutamicibacter protophormiae</i> <i>Chryseobacterium indologenes</i>

店舖 C	菌名
TOFMS	<i>Cupriavidus gilardii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Lelliottia amnigena</i>
16s rDNA	<i>Chryseobacterium sp.</i> <i>Mobilicoccus Pelagius</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Citrobacter murlinae</i>

店舖 D	菌名
TOFMS	<i>Aeromonas sobria</i> <i>Aeromonas veronii</i>
16s rDNA	<i>Corynebacterium testudinoris</i>