

令和 7 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

食肉中のカンピロバクターの殺菌法と生菌数の新規定量法の構築

研究代表者 畑中 律敏 大阪公立大学大学院 獣医学研究科 准教授

研究要旨

昨年度までに *Campylobacter jejuni*, *C. coli* の生菌のみを特異的に検出・定量するための PMA-ddPCR 系を構築した。今年度（令和 7 年度）は塩素系消毒薬で処理した検体より、処理前と処理後の生菌のみを構築した PMA-ddPCR でそれぞれ定量し、消毒薬等による処理の効果を ddPCR で迅速に評価できるか検証を試みた。

A. 研究目的

我が国の細菌性食中毒の中でカンピロバクター食中毒は、事件数・患者数とも常に上位に位置し問題となっている。カンピロバクター食中毒の多くは、本菌で汚染された食肉を加熱不十分な状態で喫食することが原因と考えられている。また、我が国には「鳥刺し」や「たたき」といった半生の状態で喫食する食文化もあり、食中毒の発生リスクが高まる。そのため、カンピロバクター食中毒を減らすためには食肉の汚染をいかに減らすかが重要であり、そのためには迅速に生菌を検出・定量し消毒薬等で殺菌および評価する方法を確立することが重要である。しかしながら、消毒薬の評価は多くの場合、試験管内で対象菌と薬剤を混和した後に生菌数を計測することで行われ、食品中や食肉処理現場での評価は十分とはいえない。その背景には生菌と死菌を区別するためには培養法に依存せざるを得なく、迅速性や

感度の問題もある。そこで本研究では、鶏肉のカンピロバクター汚染に焦点をあて、食鳥処理場や調理現場にも応用できる方法を提案するための基盤データの収集を目的に、培養法と同等の生菌の定量値を迅速に定量する PMA-Droplet Digital PCR (ddPCR)法の構築を行うとともにカンピロバクターを汚染させた鶏肉を塩素系消毒薬で処理し、殺菌効果の検討を行う。また、塩素系消毒薬で処理した鶏肉についても構築した PMA-ddPCR で生菌の定量を試みた。

B. 研究方法

1) 培養法および PMA-ddPCR による鶏肉中の生菌数の定量

C. jejuni 81-176 株を血液寒天培地を用い 24 時間 37℃で培養した後、菌数を調整し 10 g の鶏肉に 1.0×10^8 CFU/g となるように植菌した。植菌後、鶏肉を室温で 30 分間静置した後に、90 mL の Buffered Pepton Water で

ストマッキングを行い揉みだし液を作製した。この揉みだし液を 1 mL 取り出し 13,000 g で遠心後上清を捨て 100 μ L の PBS で懸濁後 PMA 処理を行い、アルカリ熱抽出法で DNA テンプレートを作製した。作製したテンプレートは、構築した PMA-ddPCR にて定量を行った。

また培養法で生菌数を定量するために、揉みだし液を 1 mL 取り出し PBS で 10 倍段階希釈を行い、各希釈段階を mCCDA 培地 3 枚に 100 μ L ずつ塗抹し、37°C 嫌気条件 (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) 下で 48 時間培養し、発育したコロニー数を計測し生菌数を定量した。実験は 3 回行った。

2) *Campylobacter* で汚染した鶏肉に対する塩素系消毒薬による殺菌効果および生菌数の定量

C. jejuni 81-176, Chi2 (鶏肉由来), 8214 (ウシ由来)、*C. coli* CBF48-1 (鶏肉由来), Pf31 (豚肉由来) 株の計 5 株を用いた。各菌株を血液寒天培地を用い 24 時間 37°C で培養した後、1) 同様に 10 g の鶏肉に植菌した。植菌後室温で 30 分間静置後、4°C の 500 mL の蒸留水 (DW)、100 ppm の次亜塩素酸 Na または 400 ppm 亜塩素酸水 (遊離塩素濃度 25 ppm) の亜塩素酸水に 30 分間浸漬した。その後鶏肉を取り出し 90 mL の PBS とストマッキングを行い揉みだし液を作製した。揉みだし液より 1) 同様に DNA テンプレートを作製し、PMA-ddPCR を行うとともに、mCCDA を用いて培養法による生菌数の定量を行った。実験は全て 3 回行った。

C. 研究結果

1) 培養法および PMA-ddPCR による鶏肉中の生菌数の定量

鶏肉揉みだし液中の生菌数を構築した PMA-ddPCR で定量した結果、 7.10 ± 0.12 log copies/g であった。次に mCCDA を用いて生菌数を定量した結果は 7.18 ± 0.23 log CFU/g であった。これら 2 つの方法で定量した生菌数の値について t 検定を行った結果 p 値は 0.79 であり、両者に有意な差は確認されなかった。

2) 塩素系消毒薬で処理した鶏肉における生菌数の定量

C. jejuni 81-176 株を植菌し DW、100 ppm の次亜塩素酸 Na、400 ppm の亜塩素酸水に浸漬した場合の生菌数はそれぞれ、培養法で 6.32 ± 0.15 、 6.17 ± 0.11 、 3.83 ± 0.05 log CFU/g、PMA-ddPCR でそれぞれ 6.45 ± 0.19 、 6.00 ± 0.06 、 3.70 ± 0.04 log copies/g であった。培養法および PMA-ddPCR での定量値に対して t 検定を行ったが、どの条件下においても有意差は確認されなかった。また、DW 処理群と 100 ppm の次亜塩素酸 Na 浸漬群の生菌数には有意差はなかったが、DW 処理群または 100 ppm 次亜塩素酸 Na 処理群と 400 ppm 亜塩素酸水処理群では 400 ppm 亜塩素酸水処理群において有意に生菌数の減少が確認された。他の 4 菌株においても同様の結果が得られた。

D. 考察

今年度 (令和 7 年度) は昨年度まで構築してきた、生菌のみを迅速に絶対定量する PMA-ddPCR を用いて、実際の鶏肉検体における生菌数を従来の培養法と同等に定量できるか評価を行った。培養法で得られた生菌数と PMA-ddPCR で得られた生菌数には有意差はなかった。本来培養法では生菌数を得るまでに 2 日間を要していたところを、

構築した PMA-ddPCR を用いることで、約 3 ～4 時間程度で生菌数を得ることができるようになると考えられた。

さらにより多くの菌株を用いて検証を行うとともに、塩素系消毒薬にて鶏肉を処理した際の生菌数についても培養法と同等の定量値を示すことができるのか検証を行った。その結果、塩素系消毒薬で処理した鶏肉においても、培養法と同等の定量値を示すことができた。さらに、食鳥処理場で使用されている 100 ppm の次亜塩素酸 Na で処理するより 400 ppm の亜塩素酸水で処理した際の方が有意に生菌数を落とすことができ、約 2 log CFU 落とすことができていた。本結果より、食鳥処理場における体の冷却工程（チラープール）等において、次亜塩素酸 Na を使用する代わりに亜塩素酸水を使用することで、より食中毒のリスクを下げることができるかもしれない。

E. 結論

構築した PMA-ddPCR を使用することで、迅速に培養法と同等の生菌数を定量できた。さらに塩素系消毒薬にて処理した際にも定量できるため、今後食鳥処理場等の CCP のモニタリングに応用していくことで、食中毒のリスクの低減に寄与できると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表等

第 18 回 日本カンピロバクター研究会総会、
2025 年 12 月 19 日～20 日、北海道帯広、

概要

「塩素系消毒薬による殺菌効果の PMA-ddPCR による評価法の構築」優秀発表賞

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし