

令和元－3年度厚生労働科学研究（食品の安全確保推進研究事業）  
「畜産食品の生物学的ハザードとそのリスクを低減するための研究」

分担総合研究報告書

「鶏肉製品におけるカンピロバクター等の定量的汚染実態に関する研究」

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
	町田李香	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	平井和也	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	池田徹也	北海道立衛生研究所感染症部
	阿部光一郎	川崎市健康安全研究所消化器・食品細菌
	山田和弘	愛知県衛生研究所生物学部
	中村寛海	大阪健康安全基盤研究所微生物部
	野本竜平	神戸市健康科学研究所感染症部
	川瀬 遵	島根県保健環境科学研究所保健科学部

**研究要旨：**令和元年度から3年度にかけて、地方衛生研究所6機関の協力を得て、カンピロバクター定量検出試験の標準化に向けた検討を進めた上で、各地に流通する鶏肉製品を対象とした定量検出試験を実施した。最終的にカンピロバクターは、鶏モモ肉製品510検体のうち254検体（50%）より検出され、平均値（±SD）は $1.2 \pm 1.0 \log_{10}$  CFU/g、最大菌数は $4.3 \log_{10}$  CFU/gであったほか、欧州の食鳥処理場での達成目標値である $3.0 \log_{10}$  CFU/g超過は43検体（8%）で認められた。検出率の変動要因と推定された季節性については秋季>夏季>春季の順に菌数が高い状況であったほか、75日齢以上で処理された成鶏、地鶏由来検体は、75日齢未満で処理された肉用若鳥（ブロイラー、銘柄鶏）由来検体に比べて有意に低い菌数を示した。本研究を通じて得られた*Campylobacter jejuni*計111株を対象にwhole genome sequencing解析を行ったところ、Multilocus sequence typingにより計63の遺伝子型に分類され、日齢別ではST-22CC、ST-52CC及びST-607CCが75日齢未満の鶏肉由来株で認められた一方、ST-353CCは75日齢以上の鶏肉由来株でのみ認められた。1塩基配列多型に基づく系統解析により上述の日齢や季節による明確なクラスター分類はなされなかったが、菌株間で配列多様性を認めたporA遺伝子配列に基づく系統解析では、日齢の差異と一定の関連性が示唆される知見も得られた。我が国で製造加工される鶏肉製品でのカンピロバクター汚染状況には上述の変動要因のほか、食鳥処理場での衛生管理状況の差異等も影響するものと思われ、今後、より多元的な視点で、各地域での出荷直前の鶏肉製品における本菌汚染状況を定量的にモニタリングし、分離株の特性をあわせて解析していくことは、鶏肉に関わるカンピロバクター食中毒の健康影響を定量的に評価し、リスクに基づく管理の在り方を検討する上での有効な方策となるものと考えられる。

**A. 研究目的**

カンピロバクター・ジェジュニ/コリによる食中毒は、細菌性食中毒の中で最も発生

頻度が高く、その制御が社会的に求められている。カンピロバクター食中毒の原因として特定または推定された食品としては、

鶏肉等の食鳥肉が最多であり、その占有率は2011年から2012年にかけて実施された、行政施策(生食用食肉の規格基準、牛肝臓の生食提供禁止措置、豚肉・豚内臓肉の生食提供禁止措置)を経た2013年以降顕著に増加している。一方、その後は食鳥肉の消費量が増加傾向にあるほか、生食嗜好が食鳥肉に偏ったこと等から、加熱用として出荷された食鳥肉を生食に転用することで多数のカンピロバクター食中毒が発生している。国内で製造加工される食鳥肉の衛生管理については、平成30年に公布された「食品衛生法の一部を改正する法律」において、HACCPシステムの導入が求められるに至り、「認定小規模食鳥処理場での衛生管理に関する手引書」が業界団体により作成される等、制度化に向けた取り組みが推進されている。一方、流通消費段階における鶏肉製品の汚染実態については、一部で地域限定的なデータ等が取得されているが、それらの殆どは定性的なデータに留まっている。食品安全分野におけるリスク分析においては、定量的データの収集が必要不可欠とされる国際動向を踏まえると、国内に流通する鶏肉製品におけるカンピロバクター汚染実態を定量的に求めることは必要不可欠と考えられる。

以上の背景を踏まえ、本分担研究では、複数の地方衛生研究所微生物担当者の協力を得て、国内の複数地域に流通する鶏肉製品を対象としたカンピロバクターの定量検出試験を行うと共に、分離された *Campylobacter jejuni* 代表株について、遺伝学的解析を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 鶏肉製品検体

令和元年度から3年度にかけて、国内に流通する鶏モモ肉製品計510検体を購入し、供試対象とした。検体は入手後、冷蔵温度帯で輸送・保管し、24時間以内に後述の試験に供した。

### 2. 定量的検出試験

各検体の皮部分を25g無菌的に採材し、滅菌済鋏及びピンセットを用いて100mLの緩衝ペプトン水を含む滅菌済ストマッカー一袋に加え、1分間ストマッキング処理を行った。その後、速やかに懸濁液及び同階段希釈液各1mLをmCCDA寒天培地に塗抹し、微好気条件下にて $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で $44\pm 4$ 時間培養した。培養後は、発育した定型集落数を求めた上で、1検体につき原則5集落を釣菌し、PCR法を用いた確認試験に供し、上述の計数値に確認試験陽性率を乗じ、希釈倍率を反映させることで、検体1gあたりの菌数を求めた。

### 3. 分離株からのDNA抽出

*C. jejuni* 計111株をMueller Hinton寒天培地に接種し、微好気条件下で20時間培養した。その後、菌体よりMaxwell RSC DNA Blood Kitを用いてtotal DNAを抽出した。得られたDNA抽出液はTapestation 4150を用いて定量し、以下のゲノム解析に供した。

### 4. Whole genome sequencing 解析

DNA各1 $\mu\text{g}$ を鋳型として、Ion Xpress Library fragment kit 及び Ion barcode adaptor kit を用いてLibraryを作製した。

その後、AMPureXP を用いて精製し、1 Library あたり 10-11 株を pool し、Ion CHEF/ Ion GeneStudio S5 を用いた sequencing 解析を行った。得られた配列データは、不要配列を除去した後、CLC Genomic Workbench ver. 21 を用いて de novo assembly を行った。Annotation には DFAST program を用いた。

Assembled 配列は in silico multilocus sequence typing (MLST) 及び 1 塩基配列多型に基づく系統解析(SNP 解析)に供し、系統樹を作製した。また、NCTC 11168 株ゲノムを参照配列とした mapping を行い、*porA* 配列を抽出し、Mega X を用いた系統解析を行った。

## 5. 統計解析

菌数分布解析には、Mann-Whitney U 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## C. 結果

### 1. 令和元～3年度に行った鶏モモ肉製品でのカンピロバクターの定量的汚染実態調査結果

計 510 検体の鶏モモ肉製品検体のうち、カンピロバクターは 254 検体 (49.8%) より検出され、全体の平均値 ( $\pm$ SD) は  $1.15 \pm 1.03 \log_{10}$  CFU/g、最大菌数は  $4.27 \log_{10}$  CFU/g であった。菌数分布の内訳は、 $< 0.70 \log_{10}$  CFU/g (不検出) が 256 検体 (50.2%)、 $0.70-0.99 \log_{10}$  CFU/g が 27 検体 (5.3%)、 $1.00-1.99 \log_{10}$  CFU/g が 120 検体 (23.5%)、 $2.00-2.99 \log_{10}$  CFU/g が 64 検体 (12.5%)、欧州で食鳥処理段階での達成目標値として採用されている  $3.0 \log_{10}$  CFU/g を超過し

た検体は 43 検体 (8.2%) であった (表 1)。 $3.01 \log_{10}$  CFU/g を超過した検体のうち、25 検体は 3 つの食鳥処理場由来であった。他の定量的汚染実態成績に影響を及ぼしうる検体情報について探索を行ったところ、秋季の検体は春季及び夏季の検体に比べ、有意に高い菌数を示したほか、夏季検体も春季に比べ、高い菌数であった。

JAS 規格では 75 日齢以上を地鶏として命名する際の根拠の一つとしていることを踏まえ、処理日齢として 75 日齢を境界として二分し、菌数分布を比較したところ、75 日齢未満のブロイラーや銘柄鶏計 418 検体のうち、237 検体 (56.7%) が本菌陽性を示し、その平均値は  $1.29 \pm 1.08 \log_{10}$  CFU/g であった。これに対し、75 日齢以上の地鶏及び成鶏計 92 検体では 17 検体 (18.5%) が陽性となり、平均値は  $0.52 \pm 0.41 \log_{10}$  CFU/g となり、両群間には統計学的に有意な差異が認められた。なお、地域性については各地域間での検体数の差異が大きい状況であったことから、解析の対象からは除外した。

### 2. *C. jejuni* 代表株のゲノム解析結果概要

鶏肉製品由来の *C. jejuni* 計 111 株を対象として、ドラフトゲノム配列を取得した。In silico MLST 解析の結果、供試菌株は計 63 の遺伝子型に分類され、うち 45 遺伝子型は 12 の Clonal complex に属し、残り 18 遺伝子型のうち 9 遺伝子型は新規型であった (表 2)。全体では、ST-21CC が最も高頻度に検出され (24.3%)、ST-354CC 及び ST-45CC がこれに続いた。ST-22CC、ST-52CC、ST-607CC は 75 日齢未満の鶏肉由来株でのみ認められた一方、ST-353CC は 75 日齢以

上の鶏肉由来株でのみ認められた。

SNP を基とした系統樹を作製したところ、供試した 111 菌株は 2 つのクラスターに大別されたが、日齢の別による明確な偏りは認められなかった (図 1)。

SNP 解析として菌株間での有意な配列多様性を認めた、*porA* 遺伝子に着目し、各菌株の配列を基に系統樹を作製したところ、日齢との一定の関連性が示唆された (図 2)。

#### D. 考察

本研究では、鶏肉製品におけるカンピロバクターの定量的汚染実態を調査すると共に、分離株の遺伝特性について解析を行った。

欧州では 2018 年より食鳥処理場における工程管理の妥当性をリスクベースで評価するため、冷却後とたいの首皮におけるカンピロバクター定量検出試験が行われ、 $3.0 \log_{10}$  CFU/g を達成目標とした管理が行われている。欧州 7 か国 (デンマーク、エストニア、ドイツ、アイルランド、ラトビア、ルーマニア、スウェーデン) での食鳥処理場モニタリング結果として、約 7% の検体が  $3.0 \log_{10}$  CFU/g を超過したことが報告されており、同割合を低減していくことが当該地域での当面の課題として掲げられている。

国内でも HACCP に基づく衛生管理が大規模食鳥処理場に対して 2021 年 6 月より本格施行され、任意項目ながらカンピロバクター定量試験法も通知の中に盛り込まれた。現時点では食鳥処理場でのカンピロバクター定量検出試験を実施している自治体は限定的ではあるが、必須試験項目とされる衛生指標菌定量試験 (生菌数及び腸内細

菌科菌群数) の菌数分布成績はカンピロバクター菌数分布と明確な関連性がないことも確認されつつあり、食鳥処理段階でのカンピロバクター定量汚染実態の全国的把握は国際標準的なリスクベースの衛生管理の在り方を検討する上で極めて重要な課題と思料される。

欧州の一部の国では市場段階にある鶏肉検体における定量的汚染実態調査も行われており、その成績をホームページ等で掲載し、自ら取り扱う製品の情報を消費者向けに公開している大手販売事業者もある。英国に流通するハラール向けの鶏肉製品計 405 検体を対象にカンピロバクターの定量的汚染実態を調査した研究では、うち 56 検体 (13.8%) が  $3.0 \log_{10}$  CFU/g を超過したと報告している。米国でも同様に流通鶏肉に関する定量的データは近年報告されている。一方、国内では流通段階にある鶏肉製品におけるカンピロバクター汚染実態に関する定量的知見は極めて乏しい。

鶏モモ肉検体での汚染菌数分布成績から、季節性については、欧州等でも同様に高温を示す季節に高くなる傾向が認められている。この点は本研究では解析対象とはなしえなかった地域性とも関連する事項と思われる、そうした把握には今後広域的なデータの更なる集積が必要不可欠であろう。

本研究を通じて得られた成績より、国内で長期飼育された鶏由来検体における汚染菌数は短期飼育された鶏肉検体に比べ、相対的に低い分布であった。2011 年に出された Codex ガイドラインは 3 週齢以下での出荷を推奨しているが、上述の結果は長期飼育された鶏由来鶏肉製品の汚染菌数は一般的な肉用若鳥よりも相対的に低い菌数分布

を示す可能性を示唆するものと考えられる。

上述の季節性や日齢は原料に由来するリスクの変動要因と目される一方、食鳥処理場での工程管理不備に端を発する交叉汚染は二次的なリスクである。令和3年度の成績として、特定の処理場由来の鶏モモ肉製品検体では他処理場由来検体に比べて相対的に高い菌数分布を示したが、このことは食鳥処理場での工程管理に施設間多様性が大きい可能性を示唆するものと言え、食鳥処理場の HACCP 外部検証において、より積極的にカンピロバクターの定量的汚染状況を把握することがリスクベースの妥当性評価には欠かせないものと考えられる。

近年、菌株のゲノム解析は様々な目的で活用されている。カンピロバクターの多くはゲノム上でのファージ転移部位となる繰り返し配列を多数有している。本研究で一部の遺伝子型株が日齢との関連性が認められた点は、鶏腸管内での定着持続性の変動を示唆するものと思われ、その検証には引き続き鶏肉由来株を分離した上で、より詳細なゲノム解析を進めることが有用と思われる。

食鳥処理段階と流通段階での菌数変動や関連性を総合的に示す科学的知見は世界的にも乏しい状況にある。そのため、一概には言及し難いが、本研究で得られた定量成績から考えると、国内の鶏肉製品におけるカンピロバクター汚染菌数分布は英国等の欧州と同等もしくはより低い数値とみなすことができる可能性がある。但し、欧州では食鳥処理工程では一般的に殺菌剤の使用は行われていないこと、そして今回得られた成績は事業者間で極めて多様であったことを踏まえると、我が国で製造加工・流通される

鶏肉製品における本菌の定量的汚染分布に関する知見を更に集積することで、国内での鶏肉に対する本菌汚染の達成目標を設定することで、鶏肉に関わる衛生状況の更なる改善、ひいては本菌による鶏肉の喫食を介した食中毒発生低減につながることを期待される。

## E. 結論

国内の複数地域に流通する鶏モモ肉製品 510 検体を対象としたカンピロバクターの定量的汚染実態を調査し、254 検体 (49.8%) がカンピロバクター陽性であること、平均値 ( $\pm$ SD) は  $1.15 \pm 1.03 \log_{10}$  CFU/g、最大菌数は  $4.27 \log_{10}$  CFU/g となること、うち 43 検体 (8.2%) では欧州の食鳥処理場での達成目標値である  $3.0 \log_{10}$  CFU/g を超過する状況を把握した。製品情報を踏まえた解析を通じ、日齢や季節性が菌数分布に影響することが確認された。鶏肉由来菌株のゲノム解析を定量的モニタリングとあわせて活用することは工程管理の妥当性評価をはじめ、フードチェーン全体での本菌の動態を総合的に把握する上で喫緊の対応が必要な課題と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1.1. Asakura H et al. Bacterial Distribution and Community Structure in Beef Cattle Liver and Bile at Slaughter. *J Food Prot.* 2022;85(3):424-434.

### 2. 学会発表

2.1. 朝倉宏ら. 食鳥処理場の衛生管理の動向と微生物モニタリングの検討状況について. 第 40 回日本食品微生物学会 (2019.11.28) 東京都.

2.2. 山本詩織ら. 異なる調理機器を用いた低温加熱調理による微生物汚染低減効果の比較. 日本食品衛生学会第 116 回学術講演会. (2020.11 月) (WEB 開催)

2.3. 朝倉宏ら. 国内流通鶏肉におけるカンピロバクターの定量的汚染実態に関する検討. 第 14 回日本カンピロバクター研究会総会 (2022.9 月) (WEB 開催)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 鶏モモ肉製品からのカンピロバクター検出成績概要.

要因	検体数	カンピロバクター菌数分布 (log CFU/g)								>3 log CFU/gの割合
		不検出	0.70-1.00	1.00-1.99	2.00-2.99	3.00-3.99	4.00-4.99	最大値	平均±SD値	
地域										
A	20	18 (90.0%)	1 ( 5.0%)	1 ( 5.0%)	0 ( 0.0%)	0 ( 0.0%)	0 ( 0.0%)	1.00	0.40 ± 0.16	0.0%
B	295	129 (43.7%)	8 ( 2.7%)	72 (24.4%)	53 (18.0%)	31 (10.5%)	2 ( 0.7%)	4.27	1.36 ± 1.12	10.8%
C	74	37 (50.0%)	7 ( 9.5%)	20 (27.0%)	10 (13.5%)	0 ( 0.0%)	0 ( 0.0%)	2.78	0.94 ± 0.75	0.0%
D	24	16 (66.7%)	3 (12.5%)	4 (16.7%)	0 ( 0.0%)	1 ( 4.2%)	0 ( 0.0%)	3.62	0.77 ± 0.82	4.2%
E	97	56 (57.7%)	9 ( 9.3%)	22 (22.7%)	1 ( 1.0%)	9 ( 9.3%)	0 ( 0.0%)	3.88	0.91 ± 0.94	9.3%
季節										
春季	86	43 (50.0%)	4 ( 4.7%)	29 (33.7%)	5 ( 5.8%)	5 ( 5.8%)	0 ( 0.0%)	3.88	0.98 ± 0.88	5.8%
夏季	263	147 (55.9%)	10 ( 3.8%)	50 (19.0%)	37 (14.1%)	19 ( 7.2%)	0 ( 0.0%)	3.78	1.10 ± 1.02	6.8%
秋季	143	57 (39.9%)	11 ( 7.7%)	37 (25.9%)	20 (14.0%)	16 (11.2%)	2 ( 1.4%)	4.27	1.39 ± 1.12	12.6%
冬季	18	9 (50.0%)	2 (11.1%)	4 (22.2%)	2 (11.1%)	1 ( 5.6%)	0 ( 0.0%)	3.02	0.99 ± 0.87	5.6%
日齢										
<75日齢	418	181 (43.3%)	23 ( 5.5%)	108 (25.8%)	63 (15.1%)	41 ( 1.0%)	2 ( 0.5%)	4.27	1.29 ± 1.08	10.3%
>75日齢	92	75 (81.5%)	4 ( 4.3%)	12 (13.0%)	1 ( 1.1%)	0 ( 0.0%)	0 ( 0.0%)	2.18	0.52 ± 0.41	0.0%
計	510	256 (50.2%)	27 ( 5.3%)	120 (23.5%)	64 (12.5%)	41 ( 8.0%)	2 ( 0.4%)	4.27	1.15 ± 1.03	8.2%

表 2. *C. jejuni* 分離株の遺伝特性概要.

Clonal complex (CC)	No. isolate	ST	No. isolate	日齢	地域		
ST-21 CC	27	21	2	Y (2)	B		
		50	9	Y (9)	B, E		
		4526	3	O (3)	B		
		6709	1	Y (1)	C		
		8132	1	O (1)	B		
		9535	2	Y (2)	C		
		9776	2	O (2)	B		
		11191	5	O (5)	B		
		11572	1	Y (1)	C		
		11574	1	Y (1)	C		
ST-354 CC	15	354	8	O (5), Y (3)	B, E		
		653	1	Y (1)	E		
		1723	1	O (1)	B		
		6196	2	O (1), Y (1)	B		
		10010	1	Y (1)	C		
		11347	1	Y (1)	E		
		11352	1	Y (1)	E		
		11	1	Y (1)	C		
ST-45 CC	11	45	2	Y (2)	C, E		
		137	1	Y (1)	B		
		538	1	Y (1)	C		
		1326	1	Y (1)	B		
		3456	1	Y (1)	B		
		9295	1	Y (1)	C		
		11192	1	O (1)	B		
		11302	1	O (1)	B		
		4108	1	O (1)	B		
		ST-464 CC	10	4389	3	O (2), Y (1)	B, E
6477	1			O (1)	B		
6704	3			Y (3)	B		
11024	1			O (1)	B		
11186	1			Y (1)	B		
440	4			O (2), Y (2)	B, E		
ST-443 CC	6	6512	2	Y (2)	B		
		22	2	Y (2)	B		
ST-22 CC	3	567	1	Y (1)	B		
		8133	2	O (2)	B		
ST-353 CC	3	10013	1	O (1)	B		
		918	2	O (1), Y (1)	B, E		
ST-48 CC	2	52	2	Y (2)	C		
ST-52 CC	2	11190	1	O (1)	B		
ST-460 CC	1	2282	1	O (1)	B		
ST-206 CC	1	3646	1	Y (1)	E		
		11569	1	Y (1)	C		
ST-607 CC	2	407	1	Y (1)	B		
		468	1	Y (1)	E		
Unassigned	28	922	1	Y (1)	C		
		1972	2	O (2)	B		
		4324	1	Y (1)	B		
		4325	1	Y (1)	E		
		6085	1	O (1)	B		
		8071	4	O (1), Y (3)	B, C, E		
		8287	1	Y (1)	C		
		11187	1	O (1)	B		
		11189	1	O (1)	B		
		11194	1	O (1)	B		
		11195	2	Y (2)	B		
		11342	1	Y (1)	B		
		11343	1	O (1)	B		
		11344	6	Y (6)	B		
		11349	1	Y (1)	E		
		11570	1	Y (1)	C		
		計	111	-	111	Y (68)	-
				-	-	O (43)	-
				-	-	Y+ O (111)	-



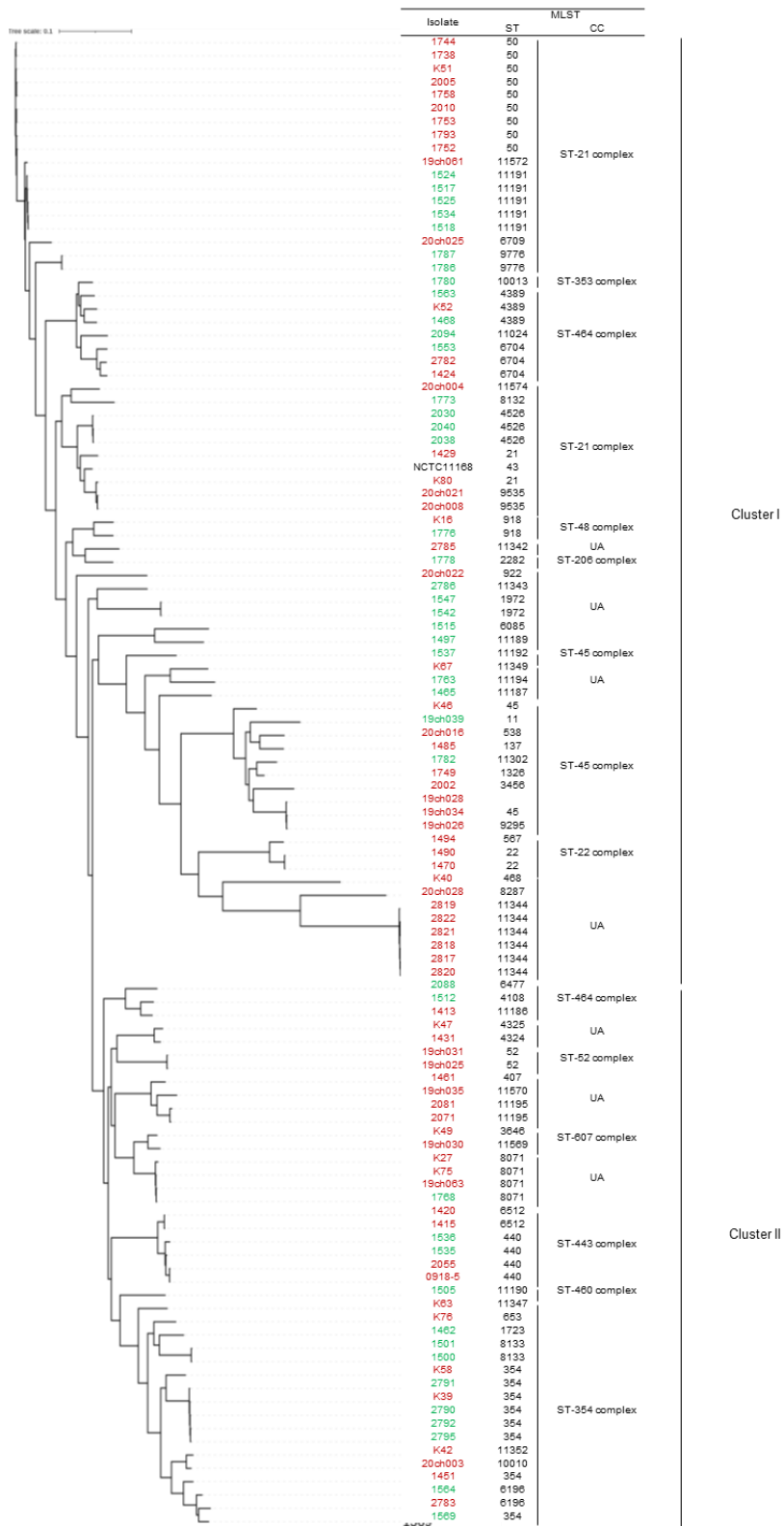


図 1. SNP 配列多型に基づく、*C. jejuni* 株の系統樹。

緑色、赤色はそれぞれ 75 日齢以上、75 日齢未満の鶏肉由来株を指す。

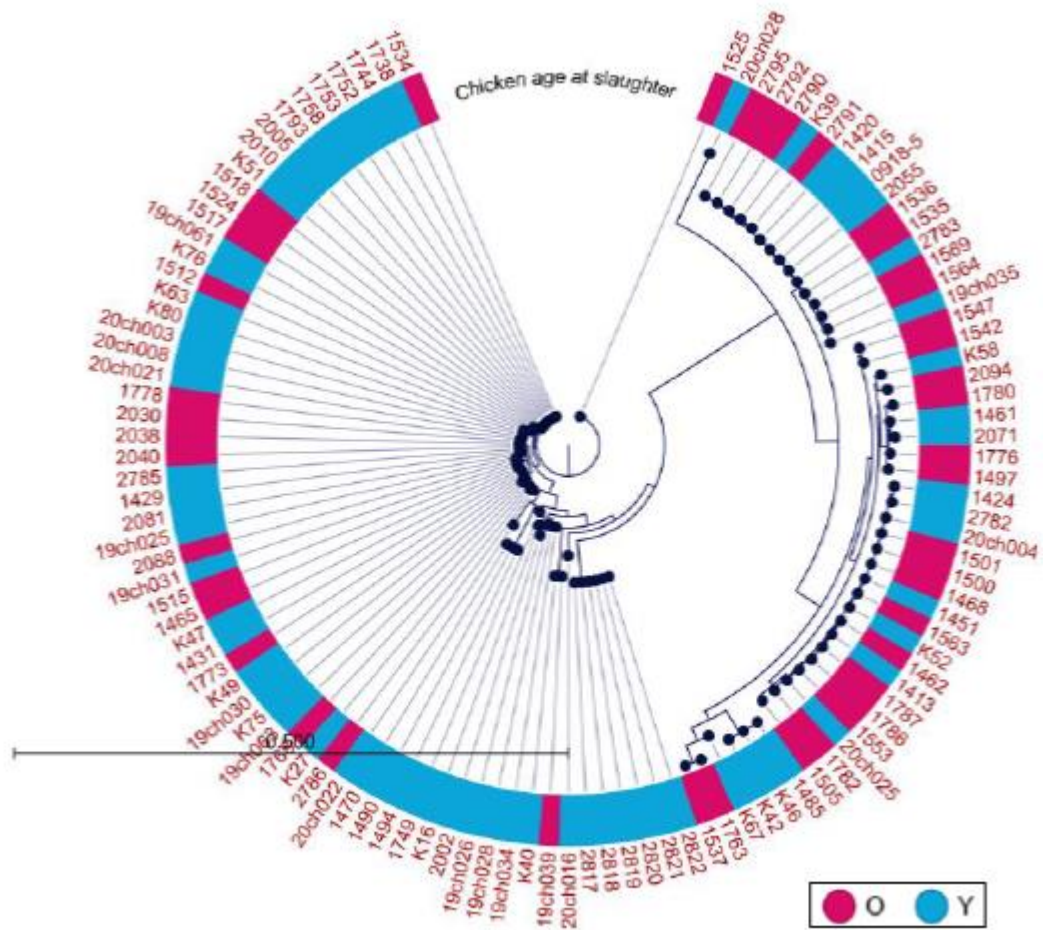


図 2. *porA* 配列多型に基づく系統樹.

O は 75 日齢以上、Y は 75 日齢未満の鶏肉由来株を指す。