

「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」

研究代表者 佐々木貴正 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第一室長

**研究要旨：**我が国における鶏肉製品のカンピロバクターやサルモネラ汚染率は依然として高く、これら細菌による食中毒の原因食品として推定されることも多く、更なる汚染防止策の確立及びその推進が社会的に求められている。このため、更なる汚染防止策の構築・推進に向け、リスクアナリシスの考え方に基づいた微生物規格基準の設定等に資する知見を進展・集積させる必要がある。そこで、本研究では当該製品を対象とした微生物定量的汚染実態データの集積を図ることを目的として、3年に渡り①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、②畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究、③鶏肉加工製品におけるサルモネラ等の汚染実態に関する研究、④畜産食品の加工工程におけるリスク低減手法とその効果に関する研究を行った。①では、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、鶏モモ肉製品 510 検体を調査した。その結果、254 検体（50%）からカンピロバクターが検出され、菌数の平均値（±SD）は  $1.2 \pm 1.0 \log_{10}$  CFU/g、最大菌数は  $4.3 \log_{10}$  CFU/g で、欧州の食鳥処理場での達成目標値である  $3.0 \log_{10}$  CFU/g 超が 43 検体（8%）で認められた。さらに、遺伝子解析により遺伝子型と日齢の間に一定の関連性が示唆される知見が得られた。②では、鶏肉製品におけるカンピロバクター汚染の定量的データを効率的に収集するために不可欠な多検体処理可能な迅速定量試験法の候補として国際的な第三者認証機関における妥当性評価を受けた自動生菌数測定装置を用いた迅速定量試験法（TEMPO 法）を選定し、鶏肝臓 189 検体及び鶏皮（ムネ皮）276 検体を用いて ISO 法に準じた定量試験法（mCCDA 法）との比較試験を実施した。その結果、両試験法間に高い相関性（鶏肝臓： $R^2=0.91$ 、鶏皮： $R^2=0.96$ ）が認められ、TEMPO 法を用いることで迅速・効率的に大量の定量データを収集できる可能性があることが示された。③では、NIHSJ 法を基とする最確数（MPN）3 本法を確立した上で、つみれや肉団子などの鶏肉加工品 95 検体を検体としてサルモネラ汚染状況を調査した。サルモネラ検出率は 36.1%で、菌数は  $7.5$  CFU/25g 以下の低汚染のものが多かった（63.5%）が、高い菌数（ $107.5$  CFU/25g）のものも認められた。サルモネラは 4 血清型に型別され、*Salmonella* Schwarzengrund（60.6%）が最も多かった。当該血清型の菌株間には遺伝子学的な相違は認められず、また、国産鶏肉由来株と同一の遺伝子型であった。以上より、つみれなどの鶏肉加工品におけるサルモネラ汚染は、原料となる鶏肉由来である可能性が高く、その汚染防止には、鶏肉の生産や加工段階からの取り扱いに注意していくことが必要であることが明らかになった。④では、高圧処理等によるカンピロバクター、サルモネラ等の低減効果について検討した。その結果、焼き鳥モモ串を検体とした場合、高圧処理（500 MPa で 10 分間）後に加熱調理（200℃で 5 分間）を行うことで大きな色調変化なく、カンピロバクター及びサルモネラを定量下限値以下にすることができ、加熱調理に用いる鶏肉の菌数低減処理として、高圧処理が有用であることが示された。

研究分担者：

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者：

町田季香 国立医薬品食品衛生研究所

平井和也 国立医薬品食品衛生研究所

池田徹也 北海道立衛生研究所

阿部光一朗 川崎市健康安全研究所

山田和弘 愛知県衛生研究所

中村寛海 大阪健康安全基盤研究所

野本竜平 神戸市健康科学研究所

川瀬 遵 島根県保健環境科学研究所

山本詩織 国立医薬品食品衛生研究所

米満研三 国立感染症研究所

大屋賢司 国立医薬品食品衛生研究所

林谷秀樹 東京農工大学

鈴木穂高 茨城大学

西海理之 新潟大学

筒浦さとみ 新潟大学

Maksimenko Anastasiia

新潟大学

北條 有紗 新潟大学

王 偉童 新潟大学

野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所

百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所

## A. 研究目的

我が国では、畜産食品における食中毒菌の汚染防止を目指し、食肉加工施設等における衛生対策に積極的に取り組んでいるが、依然として畜産食品から食中毒菌がしばしば分離される。特に鶏肉製品におけるカンピロバクターやサルモネラ汚染率は、総じて高く、更なる汚染防止策の確立及びその推進が社会的に求められている。また、近

年、国際的に食品安全領域においてリスクアナリシスの考え方が導入され、食品の微生物規格に基準値が設定されるようになってきた。このことは、定量的汚染実態データの集積・分析が必要であることを示しているが、これまでの上記食中毒菌の汚染実態に関する研究の多くは定性試験の結果に限局される場合が極めて多く、定量的データの創出が国際整合を確保する上で必要不可欠である。

以上の背景から、国内主要消費地に流通する市販鶏肉製品におけるカンピロバクターの汚染実態及び鶏肉加工製品におけるサルモネラの汚染実態を定量的に把握する特色ある研究（①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、②畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究、③鶏肉加工製品におけるサルモネラ等の汚染実態に関する研究、④畜産食品の加工工程におけるリスク低減手法とその効果に関する研究）を令和元年度から開始した。

## B. 研究方法

### 1. 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

#### 1.1. 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時間以内に試験に供した。

#### 1.2. 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ク一袋に加え、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。

### 1.3. 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。

### 1.4. 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。

### 1.5. 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。

## 2. 畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究

### 2.1 候補試験法の選定

多検体処理が可能であり、作業者の技量差による試験結果への影響を勘案し、作業工程の多くが自動化されている TEMPO 法を候補試験法として選定した。なお、TEMPO 法で使用する市販キットの対象検体は、研究開始時において食鳥洗い液及びスポンジ検体とされている。

### 2.2 検体入手

#### (1) 肝臓

食鳥処理場での直接採取又は食鳥処理場包装品を小売店又はネット通販で購入した。

#### (2) 鶏肉 (ムネ肉) 製品

食鳥処理場以降の交差汚染の影響を避けるため、国産ムネ肉は、食鳥処理場で直接採取又は食鳥処理場包装品 (真空包装品) を小売店で購入した。

### 2.3. ガス置換包装品

本研究への協力が得られた鶏肉生産者 2 社 (A 及び B) の協力の下、ガス置換包装品 (ムネ肉及び肝臓) について、通常包装品 (トレーパック品) とガス置換包装品を採取するとともに、一部の製品については、当該製品の由来となった鶏群のカンピロバクター感染状況を確認するために、5 羽の盲腸内容物を採取した。なお、A 社製のガス置換包装のガス組成は酸素 80% に二酸化炭素 20% (酸素充填品)、B 社のガス置換包

装のガス組成は窒素 70%に二酸化炭素 30% (窒素充填品)であった。

## 2.4. 試験法

### (1) カンピロバクター

鶏肝臓では、検体 (1 製品につき肝臓 5 個を個別に検査) を緩衝ペプトン水 (BPW) で 2 倍希釈し、1 分間のストマック処理後 (2 倍希釈液) に、BPW を加えて 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液を作製し、2 倍希釈液では 2 枚の mCCDA に 0.2mL ずつ、他の 2 つの希釈液では各 2 枚の mCCDA に 0.1mL ずつを塗抹し、培養後に培地上に形成された集落数を集計し、その平均値を検出菌数として採用した。定量限界値は 1.0  $\log_{10}$  CFU/g であった。

鶏皮 (ムネ皮) では、食鳥処理場包装品又は一般的包装品 (トレーパック品) から 1 検体あたり、ムネ肉ブロックを 3 又は 4 個抜き取り、これらブロックからはぎ取った皮 (計 80g 以上) を BPW で 2 倍希釈し、1 分間のストマック処理を実施した (洗い液)。その後、洗い液を 15mL 試験管に 2mL 分注し、BPW を加えて 10 倍希釈液を作製した。その後、2 倍希釈液は 5 枚の mCCDA 平板に 0.2mL ずつ、5 倍希釈液は各 2 枚の mCCDA に 0.1mL ずつを塗抹し、微好気培養後 (42°C、2 日間) に得られた集落数を集計し、その値を検出菌数として採用した。定量限界値は 0  $\log_{10}$  CFU/mL (1 CFU/mL) であった。

TEMPO 法では、操作プロトコールに従い、検体を調整し、培養後に TEMPO 機器により算出された値を採用した。

盲腸内容物は、BPW で 10 倍段階希釈し、各希釈段階の希釈液を 2 枚の mCCDA に 0.1mL ずつ塗抹し、培養後に得られた集落

数を集計し、その値を検出菌数として採用した。定量限界値は両方ともに 0.7  $\log_{10}$  CFU/g であった。

検出されたカンピロバクターについては、PCR 法により菌種の同定を行った。さらに、食鳥処理場包装品については、各検体の 1 菌種 1 株について、multilocus sequence typing (MLST) と薬剤感受性試験を実施した。

### (2) 一般生菌数及び腸内細菌科菌群数の測定

ガス置換包装による細菌の増殖抑制効果の調査では、鶏皮 (ムネ皮) 及び鶏肝臓について、カンピロバクター定量試験用に調整した希釈液を基に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて 10 倍希釈液、100 倍希釈液、1,000 倍希釈液、10,000 希釈液を作製した。その後、一般生菌数の測定では、各希釈液の 2.0 mL を 2 枚の生菌数測定用プレート (3M 社) に各々 1.0 mL 分注し、好気条件下で  $48 \pm 2$  時間培養 (37°C) した。また、腸内細菌科菌群数の測定では、各希釈液の 2.0 mL を 2 枚の腸内細菌科菌群数測定用プレート (3M 社) に各々 1.0 mL 分注し、好気条件下で  $24 \pm 2$  時間培養後 (37°C) した。培養後、集落数を計測し、プレート上の集落数が 15-150 個であった希釈液の 2 枚の平均値を菌数として算出した。

## 3. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ等の汚染実態に関する研究

### 3.1. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法の確立

鶏肉加工製品へのサルモネラの添加回収試験を行い、サルモネラ標準試験法を基としたサルモネラ定量試験法の確立を行った。

#### (1) 製品への接種

鶏肉加工製品への添加回収試験には、鶏肉由来サルモネラ (*Salmonella* Schwarzengrund SEC1011 株) を用いた。カジトン培地に保存した SEC1011 株を Trypticase Soy Broth (TSB, OXOID) に接種し、37°Cにて18時間培養した。この菌液を PBS にて10倍階段希釈し、想定 10<sup>3</sup> もしくは 10<sup>2</sup> CFU/mL の希釈液 500 µL を鶏肉加工製品(つみれ)に接種した。ストマッカー袋中の鶏肉加工製品(25g)に調製した菌液を接種し、十分に手もみ処理をしてなじませた。実際の接種菌数は、菌液の10倍階段希釈液を Trypticase soy agar (TSA、OXOID) に塗抹し、37°Cで18時間培養して形成された集落数を集計し計算した。

#### (2) 最確数法によるサルモネラの定量

サルモネラ標準試験法を最確数(MPN)3本法による定量検査に応用することを検討した。菌液を接種した鶏肉加工製品(25g)にペプトン加生理食塩水 225 mL を加え、1分間、ストマッカー処理し乳剤とした。調製した乳剤を2倍濃度のBPWを10mL入り試験管3本へ10mLずつ接種した。また、10mLのBPW入り試験管3本へ同乳剤を1mLずつ、さらに10mLのBPW入り試験管3本へ0.1mLずつ接種した。計9本の試験管を37°Cにて、22±2時間前培養した。この前培養液を9本の試験管からそれぞれ、Rappaport Vassiliadis (RV) 培地 (OXOID) へ1mL及びTetrathionate (TT)培地 (OXOID) へ0.1mL接種し、42°Cにて22±2時間選択増菌培養した。選択増菌培養液をよく攪拌し、1白金耳量を生分離用培地へ画線塗末し、37°Cにて22±2時間培養した。分離用培地は、硫化水素の産

生により判定する分離用寒天培地3種類及び硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地4種類を用いた。各培地に形成されたサルモネラの定型集落を3ヶずつ Triple sugar iron (TSI) 寒天培地 (栄研化学) 及び Lysine Indole Motility (LIM) 培地 (日水製薬) に接種し、37°Cで22±2時間培養した。培養後、定型的サルモネラの性状を示した菌株について、サルモネラ免疫血清 (サルモネラ免疫血清「生研」、デンカ生研) を用いてO抗原の血清凝集試験を行い、サルモネラであることの確定及びO血清群の決定を行った。サルモネラ陽性を示した試験管の本数から、米国農務省食品安全検査局微生物検査ガイドブック MLG Appendix 2.05 に従いMPN値を求めた。

### 3.2. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ汚染状況

#### (1) 供試材料

2020年10月-2021年3月に東京都ならびに神奈川県のスーパーマーケットや小売店計39軒で購入した国産鶏肉を原材料とした鶏肉加工品95検体を供試検体とした。供試検体は購入後、冷蔵条件下で研究室に運搬し、ただちに実験に供した。

#### (2) 定性試験

供試検体25gを緩衝ペプトン水(BPW、OXOID)225mLに接種し、37°Cで22時間増菌培養を行った後、その1mLをテトラチオネート液体培地(TT)(OXOID)に、0.1mLをラパポート・バシリアディス液体培地(RV)(OXOID)に接種し、42°Cで22時間培養した。そして、それぞれの液体培地からMLCB(日水)、XLD(OXOID)およびCHROM agar *Salmonella* (CHROMagar)

に接種し、37°Cで22時間培養した。選択培地に発育したコロニーからサルモネラが疑われるコロニーを各選択培地からそれぞれ3コロニーを釣菌し、純培養後、生化学試験を実施し、サルモネラを同定した。

### (3) 定量試験

定性試験でサルモネラ陽性になった供試検体について、最確数法 (Most probable number method: MPN 法、3 本法)を用いて定量を行った。定性培養時、低温下で保存しておいた供試検体 25 g をペプトン加生理食塩水 225 mL に加え、ストマッカーで良く混和後、その 10 mL を 2 倍量の BPW10 mL に、1 mL を BPW10 mL に、0.1 mL を BPW10 mL に、それぞれ 3 本ずつに加え、37°Cで22時間培養した。その後、同様に、分離・同定を行い、サルモネラを分離した。

### (4) 血清型別

分離されたサルモネラ菌株は、市販抗血清(デンカ生研)を用いて、O 抗原と H 抗原を決定し、血清型を同定した。

## 3.3. *S. Schwarzengrund* の分子遺伝子型別

### (1) 供試材料

2021 年度に、国産鶏肉を原材料とした鶏肉加工品 95 検体から分離した *S. Schwarzengrund* 20 株を供試菌株とした。

### (2) 供試菌株の分子遺伝子型別

アガロースプラグの作製は、プラグ作成キット (Bio-Rad) を用いて、以下の方法で行った。供試菌株を TSA 平板培地に塗抹し、37°Cで24時間培養を行った。培地上に発育したコロニーを LB 液体培地 10mL に接種し、25°Cで1晩培養後、培養液にクロラムフェニコールを 180 g/mL になるよう添加した。培養菌液 1 mL を 15,000 rpm で5分間遠心後、上清を捨て、Cell Suspension

Buffer (Bio-Rad) 50  $\mu$ L に懸濁し、50°Cで保持した。これに 50°Cに保持した 2%クリーンカットアガロース (Bio-Rad) 50  $\mu$ L を混合し、型に移して固形化させた。固まったプラグは型から取り出し、Lysozyme solution (Bio-Rad) 250  $\mu$ L とともに 2mL マイクロチューブに入れて、37°Cで2時間反応させた後、Lysozyme solution を取り除き、滅菌蒸留水でプラグを洗浄後、Proteinase K reaction buffer (Bio-Rad) 500  $\mu$ L を加え、50°Cで1晩反応させた。反応後、Proteinase K reaction buffer を除去し、Wash buffer (Bio-Rad) 1mL を加え、室温で1時間軽く振盪させながらプラグを洗浄した。その後、Proteinase K の不活性化のため、1mM phenyl methane sulfonyl fluoride (SIGMA-ALDRICH Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.) を添加した Wash buffer で2度洗浄後、Wash buffer による洗浄を再度行った。最後に、0.1×Wash buffer で洗浄を行った。作成したアガロースプラグは、染色体 DNA 1  $\mu$ g に対し制限酵素 *Not I* (タカラバイオ) を 1.5  $\mu$ L 含むように調整した反応液中に入れ、37°Cで1晩反応させた。その後、Loading buffer (タカラバイオ) 3  $\mu$ L を添加して酵素反応を止め、反応液を除去後、Wash buffer でプラグを1時間洗浄した。電気泳動は、1.2% Agarose NA (Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, England) のウェルに、作製したプラグを挿入後、0.5%クリーンカットアガロースで封入した。パルスフィールドゲル電気泳動は、泳動装置に CHEF-DR® II Pulsed Field ElectroPhoresis Systems (Bio-Rad) を使用し、14°C、200V、パルスタイム 2.2~63.8 秒、泳動時間 19 時間電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルはエ

チジウムブロマイド溶液で染色し、UV を照射して撮影後、得られたバンドパターンの解析を行った。なお、PFGE パターンの解析にあたり、Tenover らの提言に従い、検出されたバンドが1つまたは2つしか違わないものは同じ PFGE パターンと判断した。

### (3) MLST

供試菌株を TSB 培地で、37°C で 24 時間培養後、アルカリ熱抽出法を用いて、DNA 抽出を行った。そして、サルモネラの House Keeping 遺伝子である *aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA* 及び *thrA* の 7 つ遺伝子を標的とし、これらの遺伝子を各々の PCR 条件で標的遺伝子の増幅を行った。増幅産物については、塩基配列を決定し、供試菌株の MLST タイプを決定した。

## 4. 畜産食品の加工工程におけるリスク低減手法とその効果に関する研究

### 4.1 検体

1 年目の鶏モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツは、東京都内及び新潟市内の鶏肉専門店で購入した。高圧処理による肉質変化の検討に用いる鶏モモ肉及びムネ肉は、筋線維の方向が同一になるように 3×3×1 cm の大きさに切断した。砂肝は筋膜を除去してから半割にし、ハツは半割にして血餅を除去した。菌数低減効果の検討に用いる検体は、滅菌済みの器具を用いて 10 g 片に切断した。

2 年目の焼き鳥モモ串は、神奈川県内の鶏肉専門店で購入した。

3 年目の焼き鳥モモ串は、神奈川県内及び東京都内の鶏肉専門店で購入した。検体は、高圧処理用袋に入れて密封したのち、水と共に外袋に密封して二重包装とした。

### 4.2. 高圧処理

二重包装済みの検体について、Dr. CHEF (神戸製鋼所) を用いて 100、200、300、400 及び 500 MPa で 10 分間の高圧処理を行った。

### 4.3. 加熱調理

2-3 年目の加熱調理には、Cook Evario (ホシザキ) を用いた。余熱を行い、200°C に達したところで検体をオープンに入れ、10 分、7 分及び 5 分の加熱調理終了後にただちにオープンから出して、室温まで放冷後、検体を菌数測定及び肉質変化の測定に用いた。3 年目は、2 年目に見い出された食中毒菌が生残しうる加熱調理条件として、200°C 5 分間の条件を用いた。

### 4.4. 菌数測定

検体 10 g に 90 mL の滅菌リン酸緩衝液 (PBS、メルク) を加えてストマッカー処理を行い、10 倍乳剤を作成した。また、必要に応じて PBS を用いて 10 倍階段希釈液を作成した。1 年目は、一般細菌数の測定は、Plate Count Agar (ベクトンディッキンソン) 平板を用いた塗抹培養と並行して、簡易培地としてペトリフィルム AC プレート (3M) を用い、35 °C で 24 時間培養を行った。腸内細菌科菌群の測定にはペトリフィルム EB プレート (3M)、大腸菌群の測定にはペトリフィルム CC プレート (3M) を用い、製品に規定された条件で培養した。サルモネラの定量試験は、10 倍乳剤 100 µL を XLD 寒天培地 (オキシイド) 及び CHROMagar サルモネ (CHROMagar) に塗布し、24 時間後の定型集落数を計測し、確認培養後に集落数を確定した。サルモネラの定性試験は、ISO 6579-1:2017 に基づき、10 倍乳剤を 37 °C で 18 時間培養後にその一部を Rappaport-Vasiliadis (RV) 培地 (オキシイド)

及び Muller-Kaufman Tetrathionate (MkTTn)培地 (メルク) に接種して、所定の温度及び時間の培養を行った。その後、XLD 寒天培地及び CHROMagar サルモネラに塗布し、24 時間後の定型集落の有無を確認し、定型集落の確認培養後に結果を判定した。カンピロバクターの定量試験は、10 倍乳剤 100  $\mu$ L を CCDA 寒天 (SEL) 培地 (関東化学)、CCDA 寒天 (OX) 培地 (オキソイド) 及び mCCDA クリアーHT 寒天培地 (ベクトンディッキンソン) に塗布し、48 時間後の定型集落数を計測し、確認培養後に集落数を確定した。カンピロバクターの定性試験は、ISO 10272-1:2017 を一部改変し、10 倍乳剤 1.5 mL をボルトン培地 (オキソイド) 13.5 mL に接種し、37°C で 4 時間培養後に 41.5°C で 44 時間培養した。培養液 1 白金耳を上記の寒天培地に塗布し、微好気条件において 41.5°C で 48 時間培養した。2-3 年目は、検体 10 g に 90 mL の BPW を加えてストマッカー処理を行い、10 倍乳剤を作成した。また、必要に応じてリン酸緩衝液を用いて 10 倍階段希釈液を作成した。一般細菌数の測定は、TEMPO<sup>®</sup>AC (ビオメリュージャパン) を用い、35°C で 24 時間培養後に菌数測定を行った。腸内細菌科菌群の測定には TEMPO<sup>®</sup>EB (ビオメリュージャパン) を用い、35°C で 20 時間培養後に菌数測定を行った。カンピロバクターの定量試験は、TEMPO<sup>®</sup>CAM (ビオメリュージャパン) を用い、42°C で 48 時間微好気培養後に菌数測定を行った。サルモネラの定性試験は、10 倍乳剤を 37°C で 20 時間培養後、3 MTM 病原菌自動検出システム MDS100JPS (MDS、スリーエムジャパン) を用いて行った。カンピロバクターの定性

試験は、検体 10g を CE250 培地に懸濁し、42°C 24 時間微好気培養後に MDS を用いて行った。

データ解析時は、定量試験結果については検出下限値未満を 0 とし、全数値に 1 を加算して対数化した。検体の肉質変化の差の解析は、Student または Welch の *t* 検定により行った。

#### 4.5. 色調及び硬度

未処理及び高圧処理を行った検体について、色差計 (コニカミノルタ) を用いて色調を、レオメーター TP-10 (ヤマデン) を用いて硬度を計測した。

### C. 結果

#### 1. 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

##### 1.1. 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。 $3.01 \log_{10}$  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。

## 1.2. *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。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。

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。

## 2. 畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究

### 2.1 TEMPO 法の包含性及び排他性

TEMPO 法を提供しているビオメリュー・ジャパンの報告資料では、供試したカンピロバクター・コリ 21 株 (鶏、豚及び環境材料由来)、カンピロバクター・ジェジュニ 25 株 (鶏、カラス、七面鳥、ホロホロチョウ、牛由来)、カンピロバクター・ラリ 4 株 (鶏、カモメ由来、不明) の全株に反応 (41.5°C 培養) することが記載されている一方で、カンピロバクター・フェタス 2 株 (鶏由来)、カンピロバクター・アップサリエンティス 2 株 (糞由来) には反応 (41.5°C 培養) しないこと、また、アシネトバクター 3 株 (鶏、卵由来)、アルコバクター 6 株 (羽毛、鶏肉、糞由来、不明)、エロモナス 1 株 (不明)、サイトロバクター 1 株 (鶏由来)、エンテロバクター 1 株 (環境由来)、その他、大腸菌など、多くの菌に対して反応しないことが記載されていた。ただし、一部のラルストニア属株には反応 (41.5°C 培養) することが記載されていた。なお、当該属菌の鶏や鶏肉製品における汚染状況に関する文献情報はなかった。なお、当所で保存しているカンピロバクター・フェタス 1 株を 37°C で 48 時間培養した場合には、TEMPO 法で明瞭な反応が認められた。

### 2.2. 鶏肝臓

1-2 年目に採取した計 189 検体について、ISO 法に準じた定量試験法 (mCCDA

法) 及び TEMPO 法を実施した結果、31 検体では両試験法でカンピロバクターが検出されず、5 検体ではどちらかの試験法のみで検出され、153 検体では両試験法で検出されたが、3 検体は両試験法で定量限界値以上 (mCCDA 法:  $>4.8 \log_{10}$  CFU/g、TEMPO 法:  $>4.7 \log_{10}$  CFU/g) であった。1 試験法のみ検出された検体は、いずれも定量限界値又は定量限界値付近の低汚染検体であった。両試験法で定量値が得られた 150 検体については、高い相関性 ( $R^2=0.91$ ) が認められた。カンピロバクターが検出された検体におけるカンピロバクター数の分布 (mCCDA 法の数値を使用: 156 検体) については、 $2.0-2.5 \log_{10}$  CFU/g であったものが最も多かったが (54 検体)、 $3.0 \log_{10}$  CFU/g 以上であった検体は、16.0% (25/156) であった。検出されたカンピロバクターは、*C. jejuni* 又は *C. coli* であった。

### 2.3. 鶏皮 (ムネ肉) における TEMPO 法の同等性

2-3 年目で 276 検体を採取し、133 検体では両試験法でカンピロバクターが検出されず、18 検体ではどちらかの試験法のみで検出され、125 検体では両試験法で検出された。両試験法で定量値が得られた 125 検体の間には高い相関性 ( $R^2=0.96$ ) が認められた。なお、どちらかの試験法のみでカンピロバクターが検出された検体の菌数は、いずれも  $0.70 \log_{10}$  CFU/mL 以下であった。両試験法で定量値が得られた 125 検体について、mCCDA 法と TEMPO 法の結果を比較したところ、高い相関性 ( $R^2=0.96$ ) が認められた。

### 2.4. 国産ムネ肉製品におけるカンピロバクター汚染状況

4-12 月に計 440 検体 (24 か所の食鳥処理場で真空包装されたもの) を購入してカンピロバクターの定量試験を実施したところ、カンピロバクターは 21 か所の食鳥処理場で包装された 174 検体 (39.5%、174/440) から分離された。平均汚染菌数は、 $1.12 \pm 0.65 \log_{10}$  CFU/mL であり、菌数の範囲は、 $0-3.05 \log_{10}$  CFU/mL であった。汚染検体の中では、汚染菌数が  $1.0-1.5 \log_{10}$  CFU/mL の検体が最も多かった (32.8%)。汚染検体に占める高汚染 ( $2.0 \log_{10}$  CFU/mL 以上) 検体の割合は、10.3% (18/174) であり、高汚染の 18 検体は 7 か所 (A-G) (29.2%、7/24) の食鳥処理場で加工された製品に限定され、特に食鳥処理場 A では、汚染製品の 60.0% (6/10) が高汚染製品であった。

カンピロバクター検出率は、6 月 (41.5%) から 10 月 (53.2%) まで上昇し、その後に低下した。地域別に見ると、東日本では、5 月 (5.9%) から 10 月 (47.8%) まで上昇し、その後に低下した。西日本では 5 月 (42.9%) を除き、50%以上であり、6-8 月は 70% であった。調査期間中、カンピロバクター検出率は、東日本の方が西日本よりも低く、調査全期間における検出率は、東日本の方が西日本よりも有意に低かった (フィッシャーの正確確率検定  $p < 0.05$ )。

カンピロバクター陽性 174 検体中 137 検体から *C. jejuni* のみ、25 検体から *C. coli* のみ、残りの 12 検体からは *C. jejuni* と *C. coli* の両方が分離された。

MLST により *C. jejuni* 139 株は、57 の遺伝子型にされた。もっとも多く分離されたのは ST6704 (15 株) で、東日本にある 2 か所の食鳥処理場から出荷された 14 製品

と西日本にある 1 か所の食鳥処理場から出荷された 1 製品から分離され、すべてアンピシリンのみに耐性を示した。2 番目に多く分離されたのは ST45 (13 株) で、アンピシリン、ナリジクス酸及びシプロフロキサシンに耐性を示す株 (6 株) は西日本にある 4 か所の食鳥処理場、テトラサイクリン、ナリジクス酸及びシプロフロキサシンに耐性を示す株 (4 株) は東日本にある 1 か所の食鳥処理場、テトラサイクリンのみに耐性を示す株 (2 株) は東日本にある 1 か所の食鳥処理場、アンピシリンのみに耐性を示す株 (1 株) は西日本の食鳥処理場から出荷された製品から分離された。3 番目に多く分離されたのは ST21 で、アンピシリン、ナリジクス酸及びシプロフロキサシンに耐性を示す株 (5 株) は東日本にある 2 か所の食鳥処理場、テトラサイクリン、ナリジクス酸及びシプロフロキサシンに耐性を示す株 (5 株) は西日本にある 2 か所の食鳥処理場、ナリジクス酸及びシプロフロキサシンに耐性を示す株 (1 株) は西日本にある 1 か所の食鳥処理場から出荷された製品から分離された。4 番目に多く分離されたのは ST4622 で、アンピシリンのみに耐性を示す株 (9 株) が東日本にある 4 か所の食鳥処理場から、アンピシリン、ナリジクス酸及びシプロフロキサシンに耐性を示す株 (1 株) は東日本にある 1 か所の食鳥処理場から出荷された製品から分離された。

*C. coli* 37 株は 20 の遺伝子型に型別された。最も多く分離されたのは、ST1767 (6 株) と ST1055 (6 株) であった。ST1767 では、ナリジクス酸及びシプロフロキサシンに耐性を示す株 (3 株) が西日本にある 2 か所の食鳥処理場から、供試した薬剤のす

べてに感受性であった株 (3 株) が西日本にある 3 か所の食鳥処理場から出荷された製品から分離された。ST1055 では多様な薬剤耐性パターンを示す株 (6 株) が西日本にある食鳥処理場から出荷された製品から分離された。

## 2.5. ガス置換包装による細菌の増殖抑制効果

A 社の酸素充填品 (ムネ肉及び肝臓) 及びその通常包装品について、包装 1 日後の時点で菌数比較試験を実施した。ムネ肉については、4 回比較試験を実施し、第 3 回調査のカンピロバクターを除き、酸素充填品の方が通常包装品と比べ、菌数が少なかった。肝臓については、5 回比較試験 (カンピロバクターのみ) を実施し、第 1-3 回調査については、酸素充填品の方が通常包装品と比べ、若干菌数が少なかった。ただし、同一製品内でも肝臓の菌数には最大 2 桁の差が認められた。第 4 回調査及び第 5 回調査では、すべての検体からカンピロバクターは分離されなかった。次にムネ肉における酸素充填の効果を確認するため、包装 1 日後及び包装 3 日後の時点で 5 回比較試験を実施した。すべての調査回においてカンピロバクターは分離されなかったものの、一般生菌及び腸内細菌科菌群については、包装 1 日後で若干の菌数低減効果が認められ、包装後 3 日では明らかな低減効果が認められた。なお、ムネ肉の由来となった鶏群については、5 回のすべてにおいて盲腸内容物からカンピロバクターは分離されず、当該鶏群はカンピロバクター非保有鶏群であると推定された。

B 社の窒素充填品 (肝臓) 及びその通常包装品について、包装 1 日後及び包装 3 日

後の時点で5回比較試験を実施した。カンピロバクターは第2回及び第5回調査で分離され、第2回調査では包装1日後、包装3日後ともに窒素充填品の方が通常包装品と比べ菌数が少なかったが、第5回調査は菌数に大きな違いは認められなかった。なお、A社の肝臓と同様に、同一製品内でも肝臓の菌数には最大2桁の差が認められた。一般生菌数及び腸内細菌科菌群数については、窒素充填品の方が通常包装品と比べ菌数が若干多い傾向であった。

### 3. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ等の汚染実態に関する研究

#### 3.1. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法の確立

##### (1) 高濃度のサルモネラの添加回収試験

高濃度のサルモネラとして、想定500 CFU/500 µLに調製した菌液の実際の菌濃度は、480 CFU/500 µLであった。MPN3本法において、7種類の分離用培地におけるサルモネラ陽性管の判定結果は全て同じであった。10 mL及び1 mLの乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。0.1 mLの乳剤を接種した試験管においては、3本中2本の陽性であった。サルモネラ陽性を示した管数から算出したMPN値は1,150 MPN/25 g検体であり、この試験で得られたMPN値の95%信頼区間は225-5,000であった。

##### (2) 低濃度のサルモネラの添加回収試験

低濃度のサルモネラとして、想定0 CFU/500 µLに調製した菌液を用いた添加回収試験を3回行った。実際に接種した菌濃度は、3回の試験でそれぞれ、93、53及び60 CFU/500 µLであった。MPN3本法

において、7種類の分離用培地におけるサルモネラ陽性管の判定結果は全て同じであった。1回目の試験では、サルモネラは、10 mL及び1 mLの乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。0.1 mLの乳剤を接種した試験管においては、3本中3本とも陰性であった。サルモネラ陽性を示した管数から算出したMPN値は600 MPN/25 g検体であり、この試験で得られたMPN値の95%信頼区間は105-2,500であった。2回目及び3回目の試験結果は同じであり、いずれの試験においても、サルモネラは、10 mLの乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。1 mLの乳剤を接種した試験管においては、3本中1本が陽性であり、0.1 mLの乳剤を接種した試験管においては、3本中3本とも陰性であった。2回目及び3回目の試験において、サルモネラ陽性を示した管数から算出したMPN値は108 MPN/25 g検体であり、この試験で得られたMPN値の95%信頼区間は22.5-450であった。

#### 3.2. 鶏肉加工品のサルモネラ汚染状況

##### (1) 鶏肉加工品からのサルモネラ検出状況

サルモネラは、供試検体95検体中30検体(31.6%)から分離された。また、サルモネラは、冷蔵品から分離されたが、冷凍品からは分離されなかった。冷蔵のつみれからの分離率が高かった。

##### (2) 汚染サルモネラ菌量の定量

鶏肉加工品を汚染するサルモネラの菌量をMPN法(3本法)で測定した結果、サルモネラの汚染菌量は、<7.5~107.5 CFU/25 gであった。MPN法では検出されない菌量(<7.5 CFU/25g)のもの(63.3%)が最も多かった。

### (3) 分離されたサルモネラの血清型

サルモネラ陽性検体 30 検体から 33 菌株が分離された。分離されたサルモネラ 33 菌株は、4 血清型に型別され、*S. Schwarzengrund* (60.6%)が最も多く、次いで *S. Infantis* (24.2%)、*S. Agona* (12.1%) ならび、*S. Manhattan* (3.0%)の順であった。

### 3.3. 供試菌株の分子遺伝子型別

#### (1) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

供試菌株 20 菌株は、*NotI*を用いた PFGE で、バンドパターンが 1-2 違う菌株も見られたが、結果としていずれも同じ PFGE パターンであると判断された。

#### (2) MLST

供試菌株 20 株のうち、19 菌株は 7 遺伝子すべてが同じ塩基配列を示した。1 株は *hisD* で増幅は認められなかったものの、残りの 6 遺伝子は他の 19 菌株と同じ塩基配列を示したので、19 菌株と同じ塩基配列である可能性が高いと判断された。供試菌株の MLST タイプは、ST241 であった。

## 4. 畜産食品の加工工程におけるリスク低減手法とその効果に関する研究

### 4.1. 高圧処理が鶏肉、内臓肉及び焼き鳥の肉質変化に及ぼす影響

1 年目は、100、200、300、400 及び 500 MPa で 10 分間処理した鶏モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツについて、色調と硬度の変化を測定した。4 部位全てにおいて色調の明るさの指標である L 値及び黄色みの指標である b 値が増す傾向が見られた。モモ肉及びムネ肉では、赤みの指標である a 値には高圧処理による大きな変化は認められなかったものの、砂肝及びハツでは、圧力依存的

な a 値の上昇傾向が見られた。肉眼的観察では、いずれの部位も、300 MPa の処理により肉色に白濁がみられ、400 MPa 以上の処理で、その傾向がより顕著であった。硬度の指標である最大破断点の荷重 (N 値) はムネ肉の未処理検体では 9.855 N であったが、500 MPa での処理後は 17.738 N となり、硬化傾向を示した。同様に、モモ肉の N 値は未処理での 10.959 N から 500 MPa での処理後は 17.585 N となり、モモ肉及びムネ肉は圧力依存的に硬度が増す傾向が見られた。一方、砂肝及びハツの硬さは高圧処理によって大きく変わらないことが示された。

2 年目は、300 MPa で 10 分間処理した焼き鳥モモ串について、色調と硬度の変化を測定した。L 値は高圧処理後に 10 分間の加熱調理をした場合は 21-49.7、10 分間の加熱調理のみ場合は 23.9-44.8 であり、差は認められなかった。a 値は、高圧処理後に 10 分間の加熱調理をした場合は 0.7-2、10 分間の加熱調理のみ場合は 0.9-3.3 であり、高圧処理を行う方がやや低くなる傾向が認められた。b 値は、高圧処理後に 10 分間の加熱調理をした場合は 2.4-9.7、10 分間の加熱調理のみ場合は 5.9-12.9 であり、高圧処理を行う方がやや低くなる傾向が認められた。一方、高圧処理後に 7 分間の加熱調理をした場合 L 値は 34.4-46.4、a 値は 2-5.2、b 値は 7.8-14.6、7 分間の加熱調理のみ場合は L 値 22.4-40.6、a 値 1-3.9 及び b 値 6.4-10.5 といずれもやや増加する傾向が認められた。また、高圧処理後に 5 分間の加熱調理をした場合 L 値は 26.1-47.2、5 分間の加熱調理のみ場合は L 値 13.1-57.5 とやや低くなる傾向が見られた。高圧処理後に 5 分間の加熱調理をした

場合の a 値は 1.7–4.9、5 分間の加熱調理のみの場合の a 値 0.7–4.6 と差は認められなかった。高圧処理後に 5 分間の加熱調理をした場合の b 値は 6.4–15.2、5 分間の加熱調理のみの場合の b 値 2.7–12.5 と比較してやや増加する傾向が認められた。一方、いずれの検体も肉眼的には高圧処理の有無による加熱調理後の色調変化は強く感じられず、高圧処理による色調変化の影響は大きくなかった。

硬度の指標である N 値は 10 分間の加熱調理によって、高圧処理を行った検体では 12.941–19.534 で、高圧処理を行わなかった検体の 8.22–19.46 と同程度であった。7 分の加熱調理では、高圧処理を行った検体は 11.528–18.373 であり、高圧処理を行わなかった検体の 9.268–19.604 と同程度の硬度を示した。5 分間の加熱処理では、高圧処理を行った検体は 6.72–19.306 であり、高圧処理を行わなかった検体の 9.50–18.921 と比較して差は認められた。

3 年目は、加熱調理前の食中毒菌低減処理として効果が認められた 500 MPa で 10 分間の高圧処理を行った焼き鳥モモ串について、色調と硬度の変化を測定した。検体数は、高圧処理、加熱調理共に行わない条件で 2 検体、加熱調理のみ及び高圧処理後に加熱調理を行う条件では各 5 検体を用いた。1 回目は、加熱調理のみを行った検体と高圧処理後に加熱調理を行った検体における N 値、L 値及び a 値に有意な差は認められず ( $p$  value=0.995 (N 値)、0.053 (L 値)、0.115 (a 値))、b 値のみ高圧処理を行った検体が有意に高い結果となった ( $p$ =0.007)。2 回目の検討では、加熱調理のみを行った検体と高圧処理後に加熱調理を行った検体

における N 値、L 値及び a 値に有意な差は認められず ( $p$  value=0.141 (N 値)、0.676 (L 値)、0.480 (a 値))、b 値のみ高圧処理を行った検体が有意に高い結果となった ( $p$ =0.044)。3 回目の検討では、加熱調理のみを行った検体と高圧処理後に加熱調理を行った検体における N 値、L 値、a 値及び b 値に有意な差は認められなかった ( $p$  value=0.108 (N 値)、0.680 (L 値)、0.182 (a 値)、0.566 (b 値))。4 回目の検討では、加熱調理のみを行った検体と高圧処理後に加熱調理を行った検体における N 値、L 値、a 値及び b 値に有意な差は認められなかった ( $p$  value=0.240 (N 値)、0.936 (L 値)、0.246 (a 値)、0.975 (b 値))。5 回目の検討では、加熱調理のみを行った検体と高圧処理後に加熱調理を行った検体における N 値、L 値及び a 値に有意な差は認められず ( $p$  value=0.061 (N 値)、0.579 (L 値)、1.000 (a 値))、b 値のみ高圧処理を行った検体が有意に高い結果となった ( $p$ =0.027)。5 回の検討を通じ、N 値、L 値、a 値及び b 値の 4 つの肉質変化に関する指標のうち、b 値のみ、3 回の検討で高圧処理後に加熱調理を行った検体での数値が加熱調理のみを行った検体よりも有意に高い結果が得られたが、肉眼的な目視においては高圧処理の有無による色調の大きな差は認められなかった。

#### 4.2. 高圧処理の鶏肉、内臓肉及び焼き鳥に対する細菌の低減効果

3 年目は、鶏モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツを自然汚染している一般細菌に対する、高圧処理の菌数低減効果を調査した。処理圧力には、肉質変化が許容範囲と考えられた最大圧力である 300 MPa を用いた。高圧

処理の結果、ムネ肉中の一般細菌数は  $0.025 \log_{10}$  CFU/g、モモ肉では  $0.915 \log_{10}$  CFU/g、砂肝では  $0.875 \log_{10}$  CFU/g、ハツでは  $0.925 \log_{10}$  CFU/g 低減した。簡易培地を用いた場合の一般細菌数を混積培養の結果と比較したところ、いずれの部位でも結果の差は  $\pm 0.5 \log_{10}$  CFU/g 以内であり、ほぼ同等であると考えられた。鶏モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツを自然汚染している大腸菌と腸内細菌科菌群に対する、高圧処理の菌数低減効果を調査した。300 MPa で 10 分間の高圧処理の結果、ムネ肉中の大腸菌群菌数は  $2.462 \log_{10}$  CFU/g、モモ肉では  $2.663 \log_{10}$  CFU/g、砂肝では  $2.663 \log_{10}$  CFU/g、ハツでは  $2.643 \log_{10}$  CFU/g 低減していた。腸内細菌科菌群は、ムネ肉で  $1.519 \log_{10}$  CFU/g、モモ肉で  $1.653 \log_{10}$  CFU/g、砂肝で  $3.633 \log_{10}$  CFU/g、ハツで  $3.230 \log_{10}$  CFU/g 低減していた。大腸菌群は 4 部位全てで高圧処理により検出限界未満となったが、腸内細菌科菌群はモモ肉及びムネ肉で高圧処理後も菌が検出された。鶏モモ肉、ムネ肉、砂肝及びハツを自然汚染しているサルモネラとカンピロバクターに対する、高圧処理の菌数低減効果を調査した。高圧処理前の鶏ムネ肉、モモ肉及び砂肝からサルモネラ及びカンピロバクターが分離されたが、300 MPa で 10 分間の高圧処理の結果、ムネ肉、モモ肉及び砂肝はサルモネラが陰性となった。カンピロバクターについては、ムネ肉及び砂肝で高圧処理後に陰性となったが、モモ肉では一部検体から増菌培養後に検出された。

2 年目は、焼き鳥モモ串を自然汚染している細菌に対する、高圧処理の菌数低減効果を調査した。加熱調理時間が 10 分及び 7

分の場合、高圧処理の有無にかかわらず全検体の生菌数及び腸内細菌科菌群数が検出限界未満となった。加熱調理時間が 5 分の場合、高圧処理を行わなかった検体では未加熱検体の一般生菌数  $6.51 \log_{10}$  CFU/g から加熱調理後に  $2.82 \log_{10}$  CFU/g に低減した。一方、高圧処理を行った検体では全て検出限界未満となった。腸内細菌科菌群については、5 分の加熱調理により高圧処理の有無にかかわらず検出限界未満となった。処理前の検体は全てサルモネラ及びカンピロバクターが陰性であり、高圧処理後の加熱調理の効果は判定できなかった。

3 年目は、高圧処理による肉質変化が少なく、一般生菌数と腸内細菌科菌群数への低減効果が見られた 300 MPa で 10 分間の高圧処理後に加熱調理 (200°C で 5 分間) を行った。加熱調理のみを行った 5 検体では一般生菌数が  $3.11 - 6.23 \log_{10}$  CFU/g、平均値 ( $\pm$ SD) は  $4.21 \pm 1.19 \log_{10}$  CFU/g であった。腸内細菌科菌群数が検出下限値未満  $-2.28 \log_{10}$  CFU/g、平均値は  $0.46 \pm 1.02 \log_{10}$  CFU/g であった。高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体では、一般生菌数が  $2.20 - 4.17 \log_{10}$  CFU/g、平均値は  $3.17 \pm 0.85 \log_{10}$  CFU/g であり、高圧処理を行わなかった検体と比較して一般生菌数が平均  $1.04 \log_{10}$  CFU/g の低減を示した。腸内細菌科菌群数は全検体で検出下限値未満となった。カンピロバクター定量試験では、高圧処理を行わなかった検体でも加熱調理後には検出下限値未満となっていたが、定性試験では 5 検体中 2 検体からカンピロバクターが検出されていた。一方、高圧処理後に加熱調理を行った検体では、定量試験は検出下限値未満となり、定性試験では 5 検体中 1 検体が

陽性となった。また、サルモネラ定性試験においても、高圧処理後に加熱調理を行った検体のうち、5 検体中 1 検体が陽性となったことから、300 MPa の高圧処理では、加熱不十分な鶏肉における食中毒菌の低減効果が十分ではないことが示された。

次に、加熱調理前の高圧処理条件を 400 MPa で 10 分間とした検討を行った。加熱調理のみを行った 5 検体では一般生菌数が  $2.70 - 3.87 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、平均値は  $3.16 \pm 0.46 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体では生菌数が検出下限値未満 -  $1.65 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、平均値は  $0.84 \pm 0.80 \log_{10} \text{CFU/g}$  であった。腸内細菌科菌群及びカンピロバクターについては、加熱調理のみ行った検体及び高圧処理後に加熱調理を行った検体の全てで、検出下限値未満であった。サルモネラの定性試験は、未処理の 2 検体では陰性、加熱調理のみの 5 検体では 1 検体が陽性、高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体では全てが陰性であった。カンピロバクターの定性試験の結果は、未処理の 2 検体で陽性、加熱調理のみの 5 検体では 3 検体が陽性を示し、高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体では 1 検体が陽性であったことから、400 MPa の高圧処理では、加熱不十分な鶏肉におけるカンピロバクターの低減効果が十分ではないことが示された。

加熱調理前の高圧処理条件を 500 MPa で 10 分間とした検討については、5 回反復した検討を行った。1 回目の検討では、加熱調理のみを行った 5 検体では、一般生菌数が  $2.59 - 4.74 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、平均値は  $3.63 \pm 0.80 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、腸内細菌科菌群は検出下限値未満 -  $2.00 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、平均値

は  $0.42 \pm 0.93 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、カンピロバクターは全検体で検出下限値未満であった。高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体では生菌数、腸内細菌科菌群及びカンピロバクターが検出下限値未満であった。サルモネラの定性試験の結果は、未処理の 2 検体中 1 検体、加熱調理のみの 5 検体、高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体のいずれも全検体陰性であった。カンピロバクターの定性試験では、未処理の 2 検体全て、加熱調理のみの 5 検体中 3 検体が陽性を示したが、高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体は陰性であった。2 回目の検討では、加熱調理のみを行った 5 検体では、生菌数が  $2.30 - 3.15 \log \text{CFU/g}$ 、平均  $2.91 \log \text{CFU/g}$ 、高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体の一般生菌数は検出下限値未満 -  $1.04 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、平均  $0.21 \log_{10} \text{CFU/g}$  であった。腸内細菌科菌群とカンピロバクターの定量試験では、加熱調理を行った 5 検体と高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体の全てで検出下限値未満であった。サルモネラの定性試験の結果は、未処理の 2 検体、加熱調理のみの 5 検体、高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体のいずれも全検体陰性であった。カンピロバクターの定性試験の結果は、未処理の 2 検体中 1 検体、加熱調理のみの 5 検体では 1 検体が陽性であったが、高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体は全て陰性であった。3 回目の検討では、加熱調理のみを行った 5 検体では、一般生菌数が  $2.36 - 3.60 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、平均  $2.99 \log_{10} \text{CFU/g}$  であり、腸内細菌科菌群とカンピロバクターは全検体検出下限値未満であった。高圧処理後に加熱調理を行った 5 検体では、一般生菌数、腸内細菌科菌群及びカンピロバ



クターの全てで検出下限値未満であった。サルモネラの定性試験の結果は、未処理の2検体、加熱調理のみの5検体中1検体が陽性を示し、高圧処理後に加熱調理を行った5検体は全て陰性であった。カンピロバクターの定性試験の結果は、未処理の2検体と、加熱調理のみの5検体中3検体が陽性であったが、高圧処理後に加熱調理を行った5検体は全て陰性であった。4回目の検討では、加熱調理のみを行った5検体では、生菌数が1.61–3.34 log<sub>10</sub> CFU/g、平均2.79 log<sub>10</sub> CFU/gであり、腸内細菌科菌群とカンピロバクターは全検体検出下限値未満であった。高圧処理後に加熱調理を行った5検体では、生菌数が検出下限値未満–1.04 log<sub>10</sub> CFU/g、平均0.62 log<sub>10</sub> CFU/gであり、腸内細菌科菌群とカンピロバクター定量試験では全検体陰性であった。サルモネラの定性試験の結果は、未処理の2検体は陽性であったが、加熱調理のみの5検体及び高圧処理後に加熱調理を行った5検体は全て陰性であった。5回目の検討では、加熱調理のみを行った5検体では、一般生菌数が3.15–3.67 log<sub>10</sub> CFU/g、平均3.44 log<sub>10</sub> CFU/g、腸内細菌科菌群は検出下限値未満–1.04 log<sub>10</sub> CFU/g、平均0.21 log<sub>10</sub> CFU/g、カンピロバクターは検出下限値未満–1.04 log CFU/g、平均0.21 log<sub>10</sub> CFU/gであった。高圧処理後に加熱調理を行った5検体では、一般生菌数が検出下限値未満–1.04 log<sub>10</sub> CFU/g、平均0.42 log<sub>10</sub> CFU/gであり、腸内細菌科菌群とカンピロバクターは全検体で検出下限値未満であった。サルモネラの定性試験の結果は、未処理の2検体中1検体が陽性を示し、加熱調理のみの5検体では1検体が陽性であったが、

高圧処理後に加熱調理を行った5検体は全て陰性であった。カンピロバクターの定性試験の結果は、未処理の2検体と加熱調理のみの5検体の全てが陽性であったが、高圧処理後に加熱調理を行った5検体は全て陰性であった。

以上のように、前処理として500 MPaで10分間の高圧処理を行うことが、加熱調理が不十分な鶏肉に含まれるカンピロバクター及びサルモネラを低減させる効果があることが示された。

#### D. 考察

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<sub>10</sub> 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<sub>10</sub> 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見られる。

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 $3.0 \log_{10} \text{CFU/g}$ 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し、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。

迅速定量試験法の確立に関しては、鶏肝臓、鶏皮（ムネ皮）ともに mCCDA 法と相関性の高い ( $R^2 > 0.9$ ) の定量値を得ることができることが確認され、カンピロバクター汚染濃度が高いと考えられている鶏肝臓及び鶏皮に関し、TEMPO 法を用いることでリスク評価に必要な定量的データの入手が迅速にできる可能性が示唆された。

鶏肉加工品は、高度にサルモネラに汚染されており、その菌数は、検体によりばらつきがあり、多くは MPN 法で検出できない菌量であったが、最も菌量が多いものでは 107.5 CFU/25 g のものもあった。これらの鶏肉加工品は、主に冬期に鍋などの具材として食用に供されることが多く、スーパーマーケットや小売精肉店などでは、冬期に生の状態で冷蔵品として販売されることが多い。鶏肉がサルモネラに汚染されていることは、広く知られているが、鶏肉を加工した製品も同様に高度に汚染されていることから、つみれや肉団子といった鶏肉加工品の取り扱いには注意が必要である。また、鶏肉加工品のサルモネラ汚染は、その原料となる鶏肉由来である可能性が高く、したがって、鶏肉加工品のサルモネラ汚染を予防するためには、鶏肉の生産や加工段階から、その取り扱いに注意を払う必要が示された。

食中毒発生リスクの低減については、焼き鳥モモ串を検体とした場合、高压処理（500 MPa で 10 分間）後に加熱調理（200℃ で 5 分間）を行うことで大きな色調変化な

く、カンピロバクター及びサルモネラを定量下限値以下にすることができ、加熱調理に用いる鶏肉の菌数低減処理として、高压処理が有用であることが示された。また、ガス置換包装について、酸素充填品（酸素 80%、二酸化炭素 20%）及び窒素充填品（窒素 70%、二酸化炭素 30%）の細菌の経時的変化を調査し、酸素充填品は、通常包装品と比べ、一般生菌数及び腸内細菌科菌群数が時間経過とともに少なくなる傾向が認められ、カンピロバクターについても若干少ない傾向が認められた。一方、窒素充填品では、通常製品と比べ、いずれの菌も同等又は若干の増加傾向が認められた。ガス置換包装によるカンピロバクター及び衛生指標菌の動態については、現時点で利用されているガス組成に関する情報が少なく、また、鶏肉におけるカンピロバクター、サルモネラ等の病原細菌及び衛生指標菌の動態に関する研究報告が少ないことから、今後も情報の収集・分析が必要である。

## 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。

鶏肝臓及び鶏皮(ムネ肉)を検体とした場合、TEMPO法はISO法に準じた定量試験法(mCCDA法)と同等な試験結果が得られることが確認され、TEMPO法を用いることで、効率的にカンピロバクターの定量的実態調査を実施できると考えられた。さらに、鶏肉製品(ムネ肉)のカンピロバクター汚染は季節及び生産地域によって大きくこと、汚染菌数は食鳥処理場間で異なり、高汚染鶏肉(2.0 log<sub>10</sub> CFU/mL以上)を出荷しているのは一部の食鳥処理場に限定されることが明らかとなった。鶏肉の喫食によるカンピロバクター食中毒の低減には、高汚染鶏肉を出荷している食鳥処理場において、汚染低減対策に向けた取組を実施することが重要であり、また、各食鳥処理場における食鳥処理工程及び衛生対策実施状況等を比較することで、対策ポイント及び有効な低減策を特定できる可能性があることが明らかとなった。

つみれなどの鶏肉加工品におけるサルモネラ汚染は、原料となる鶏肉由来である可能性が高く、鶏肉加工品のサルモネラ汚染を予防するためには、鶏肉の生産や加工段階から、その取り扱いに注意を払う必要が示された。

モモ肉及びムネ肉は、圧力依存的に肉色が白化及び黄化する傾向及び肉が硬化する傾向が認められた。一方、砂肝及びハツは、高圧処理による色調及び硬度の変化が限定的であることが示された。肉質変化が比較的少ない300 MPaで10分間の高圧処理に

より、鶏肉及び内臓肉中の菌数低減が可能であった。高圧処理(500MPaで10分間)後に加熱調理(200°Cで5分間)はサルモネラ及びカンピロバクター等による食中毒の発生を減らしうる可能性が示された。また、ガス置換包装によるカンピロバクター及び衛生指標菌の動態については、現時点で利用されているガス組成に関する情報が少なく、また、鶏肉におけるカンピロバクター、サルモネラ等の病原細菌及び衛生指標菌の動態に関する研究報告が少ないことから、今後も情報の収集・分析が必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1.1. 佐々木貴正ら. 2 食鳥処理場におけるブロイラー群およびムネ肉のカンピロバクターおよびサルモネラ汚染状況と薬剤耐性. 鶏病研究会報. 第 56 巻 (2021 年 2 月) 153-158.
- 1.2. 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. 米満研三ら. 市販鶏レバーにおけるカンピロバクター汚染の定量調査. 第 13 回日本カンピロバクター研究会総会 (2020 年 10 月) (WEB 開催).

2.2. 佐々木貴正ら. 廃鶏におけるカンピロバクター汚染と薬剤耐性. 第 13 回日本カンピロバクター研究会総会 (2020 年 10 月) (WEB 開催).

2.3. 佐々木貴正ら. 国産鶏肉のカンピロバクター定量的汚染実態調査. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会 (2021 年 9 月) (WEB 開催).

2.4. 佐々木貴正、米満研三、池田徹也、朝倉宏. 国産鶏肉におけるカンピロバクター. 第 117 回日本食品衛生学会学術講演会 (2021 年 10 月) (WEB 開催).

2.5. 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.

2.6. 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)

2.7. 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)

2.8. 池内隼佑ら. 鶏肉加工品におけるサルモネラの定量汚染調査. 第 117 回日本食品衛生学会学術講演会 (2021 年 10 月) (WEB 開催)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし