

令和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」

分担研究報告書

「鶏肉食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
研究協力者	山田和弘	愛知県衛生研究所生物学部
研究協力者	川瀬 遵	島根県保健環境科学研究所保健科学部
研究協力者	中村寛海	大阪健康安全基盤研究所微生物部
研究協力者	阿部光一郎	川崎市健康安全研究所研究分担者

研究要旨：令和3年度は国内で製造加工され、販売される鶏モモ肉製品 50 検体及び鶏肝臓製品 80 検体を対象にカンピロバクターの定量的汚染実態に関する検討を進めた。鶏モモ肉検体では 15 検体（30%）より対象菌が検出され、平均値（±SD）は $1.1 \pm 1.1 \log_{10}$ CFU/g、最大値は $4.0 \log_{10}$ CFU/g であった。鶏肝臓検体では 29 検体（36%）より対象菌が検出され、平均値は $1.2 \pm 1.1 \log_{10}$ CFU/g、最大値は $4.2 \log_{10}$ CFU/g であった。前年度までに得られた鶏モモ肉におけるカンピロバクターの定量的汚染調査成績を含めて評価を行ったところ、対象菌は 510 検体のうち 254 検体（50%）より検出され、平均値は $1.2 \pm 1.0 \log_{10}$ CFU/g、最大菌数は $4.3 \log_{10}$ CFU/g となり、欧州の食鳥処理場で達成目標値として設定される $3.0 \log_{10}$ CFU/g を超過した検体は 43 検体（8%）であった。対象菌の検出成績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 により遺伝子型は計 63 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、食鳥処理場における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、各地域における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、我が国における鶏肉に関わるカンピロバクターの健康影響を定量的の把握、更にはリスクに基づく管理の在り方を検討する上での有効な手立て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。国内における本食中毒の原因食品としては、鶏肉の生食又は加熱不十分な鶏

肉料理が占める割合が高い状況が近年続いており、鶏肉の原料となる鶏の生産段階のほか、当該食品の製造・加工、流通、消費等のフードチェーン全体での総合的な衛生管理の向上並びに持続的なモニタリング等がリスク管理上の重要な対策と想定されて

いる。

本分担研究では、これまで複数の地方衛生研究所の協力を得て、各地に流通する鶏肉製品を対象とした定量的汚染実態に関する調査を行ってきた。最終年度である令和3年度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調査を継続すると共に、得られた分離菌株 (*C. jejuni*) を対象とし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3年度は国内に流通する卸向けの鶏モモ肉製品50検体及び鶏肝臓製品80検体の計130検体を16事業者より入手し、供試した。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。また、統計解析にあたっては前年度までに得られた鶏モモ肉における定量検出成績を含めて検討した。

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100 mLの緩衝ペプトン水を含む滅菌済ストマッカー袋に加え、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 ± 4 時間培養した。培養後は、発育した定型集落数を数えた上で、1検体につき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あたりの菌数を算出した。

3. 分離株からのDNA抽出

Campylobacter 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 (WGS) 解析

DNA各1 µg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) 型別及び1塩基配列多型 (SNP) に基づく系統解析に供し、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3年度に行った鶏肉製品におけるカンピロバクターの定量的汚染実態調査結

果

令和3年度は、鶏モモ肉50検体及び鶏肝臓80検体を対象としたカンピロバクターの定量検出試験を行った。鶏モモ肉検体では15検体（30.0%）より対象菌が検出され、平均値（±SD）は $1.08 \pm 1.06 \log_{10}$ CFU/g、最大値は $4.04 \log_{10}$ CFU/gであった（図1A）。鶏肝臓検体では29検体（36.3%）より対象菌が検出され、平均値は $1.23 \pm 1.10 \log_{10}$ CFU/g、最大値は $4.18 \log_{10}$ CFU/gであった（図1A）。

事業者別では、鶏モモ肉検体については、計8事業者中5事業者より入手した検体よりカンピロバクターが検出され、特に事業者F由来検体では5検体全てが $3.0 \log_{10}$ CFU/g以上の汚染を認めた（図1B）。なお、事業者E由来の5検体及び事業者H由来の5検体は地鶏肉、その他はいずれも肉用若鳥肉であった。処理方式は事業者Dのみ外剥ぎ方式で、その他は中抜き方式であった。

また、鶏肝臓検体については13事業者中7事業者より入手した検体よりカンピロバクターが検出され、特に4事業者A、G、I、J由来検体では5検体全てで陽性を示したほか、事業者I由来検体は $3.0 \log_{10}$ CFU/g以上の汚染を認めた（図1C）。なお、事業者E由来の5検体は地鶏由来肝臓であり、その他は何れも肉用若鳥由来肝臓であった。処理方式は事業者Dのみ外剥ぎ方式で、その他は中抜き方式であった。

2. 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

前年度までの成績を含め、計510検体の鶏モモ肉製品検体に関するカンピロバクター定量検出試験結果をまとめた。供試検体の

うち、対象菌は254検体（49.8%）より検出され、全体の平均値は $1.15 \pm 1.03 \log_{10}$ CFU/g、最大菌数は $4.27 \log_{10}$ CFU/gであった（表1）。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（図2A）。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（図2B）。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。

3. *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(表2)。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(表2)。

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3)。

SNP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4)。

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。また、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。

Roydenらは、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、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(J Food Prot. 84:1433-45.)。一方、国内を含めた多くの国では未だ流通段階での定量的汚染実態に関する知見には乏しい状況にある。

令和3年度は同一ロットの鶏モモ肉と肝臓を可能な限り入手し、その成績を総合的に比較することを試みた。特に外剥ぎ方式の事業者Dの成績では、肝臓検体が全て陰性であるにもかかわらず、鶏モモ肉の一部は低い菌数ながら検出されていた。このことは食鳥処理工程での交差汚染、あるいは毛

包を含む体表の汚染が原因であった可能性を示唆していると考えられる。外剥ぎ方式施設で同一ロットの肝臓と鶏肉における菌数分布の更なる評価は工程管理上の課題抽出に繋がるかもしれない。

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、今後更にデータの集積が必要な理由として挙げられよう。

本研究結果では、長期飼育される鶏肉の汚染菌数は短期飼育される鶏肉に比べ、相対的に低い分布となった。このことは、感染実験を通じ、ブロイラー鶏の盲腸内菌数は採卵鶏に比べより高いこと (*Infect. Immun.* 85: e00380-17) や、採卵鶏の長期飼育に伴う腸内細菌叢の時系列変動が盲腸内菌数低下と関連性を示すこと (*Front Vet Sci.* 8:675570) 等と合致するものと考えられる。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、長期飼育される鶏の菌数動態に関する知見は未だ乏しい。その意味において本研究成績は新規性に富むものといえる。

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差リスクは二次的なリスクといえる。3処理場由来の鶏モモ肉製品検体が相対的に高い菌数分布を示したことは、後者が大きく影響した可能性を示唆するものであり、工程管理の妥当性をリスクベースで評価していくべきことを改めて示す結果と考えられる。

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さらに集積することで、国産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事が期待される。

E. 結論

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的汚染実態を調査し、510検体中254検体 (49.8%) がカンピロバクター陽性となり、平均±SD値は $1.15 \pm 1.03 \log_{10} \text{CFU/g}$ 、最大菌数は

4.27 log₁₀ CFU/gとなること、欧州の食鳥処理場で達成目標値として設定される3.0 log₁₀ CFU/gは43検体（8.2%）で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関連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ほか、フードチェーン全体の本菌の動態を図る上で有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Asakura H et al. Bacterial Distribution and Community Structure in Beef Cattle Liver and Bile at Slaughter. J Food Prot. 2022 Mar 1;85(3):424-434.

2. 学会発表

朝倉ら. 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 (2022.9.24)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

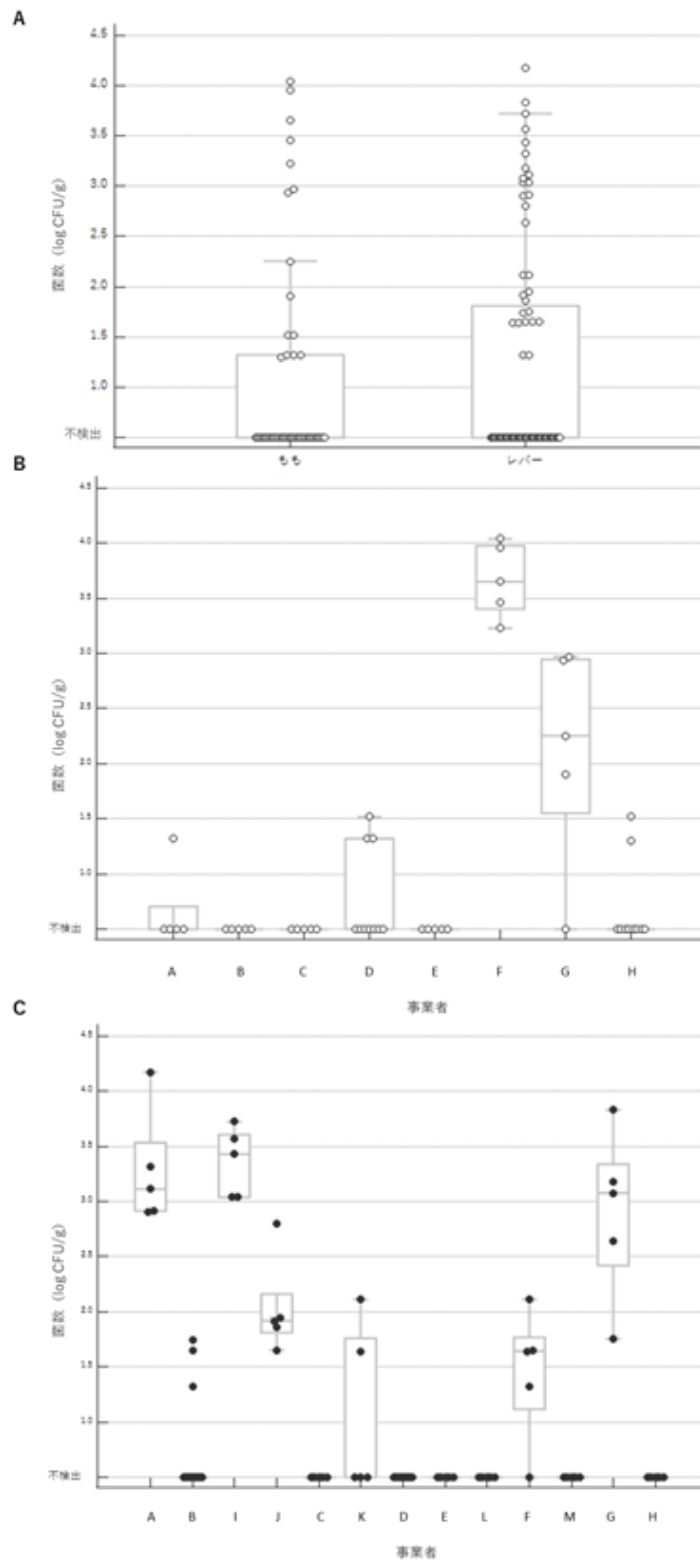
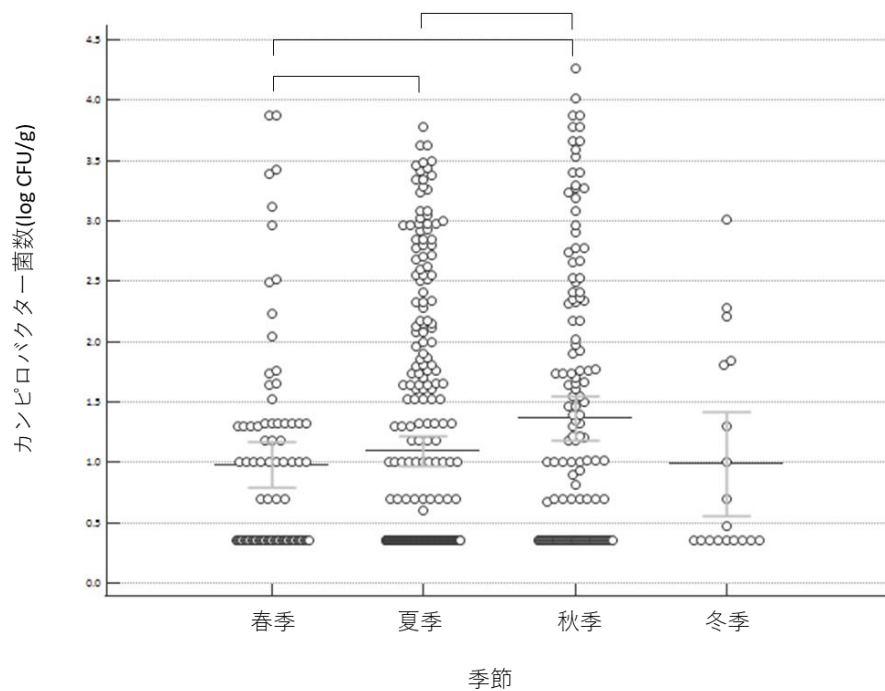


図 1. 令和 3 年度に行った鶏モモ肉及び鶏肝臓検体におけるカンピロバクターの定量的汚染調査成績概要。

セクション A は部位別の菌数分布、セクション B 及び C は事業者別に鶏モモ肉及び鶏肝臓検体の菌数分布を示す。

A



B

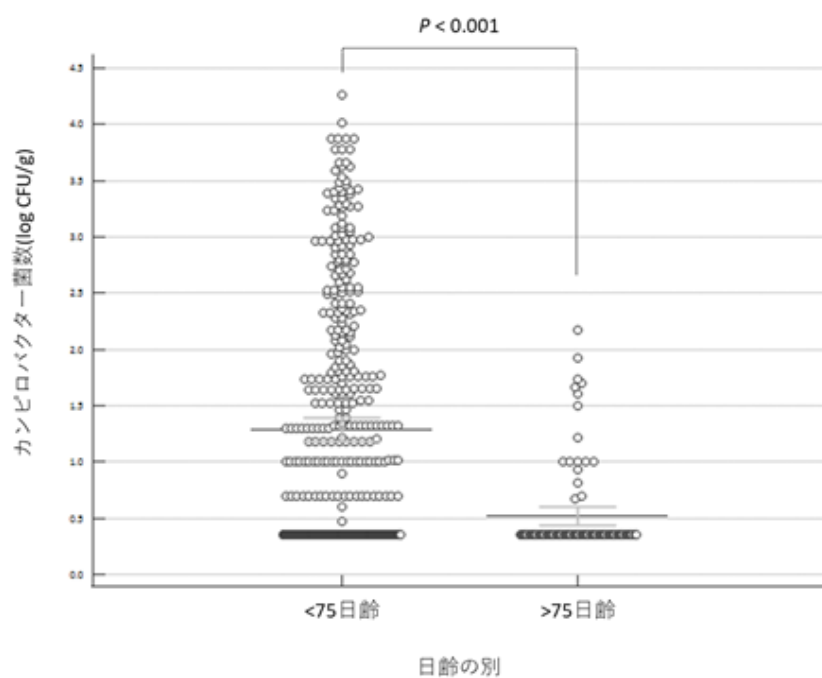


図 2. 季節性・処理日齢の別による、鶏モモ肉製品検体におけるカンピロバクター汚染分布.

セクション A は季節性 (春季、夏季、秋季、冬季)、セクション B は日齢 (75 日齢未満または 75 日齢以上) の間での菌数分布をそれぞれ示す。

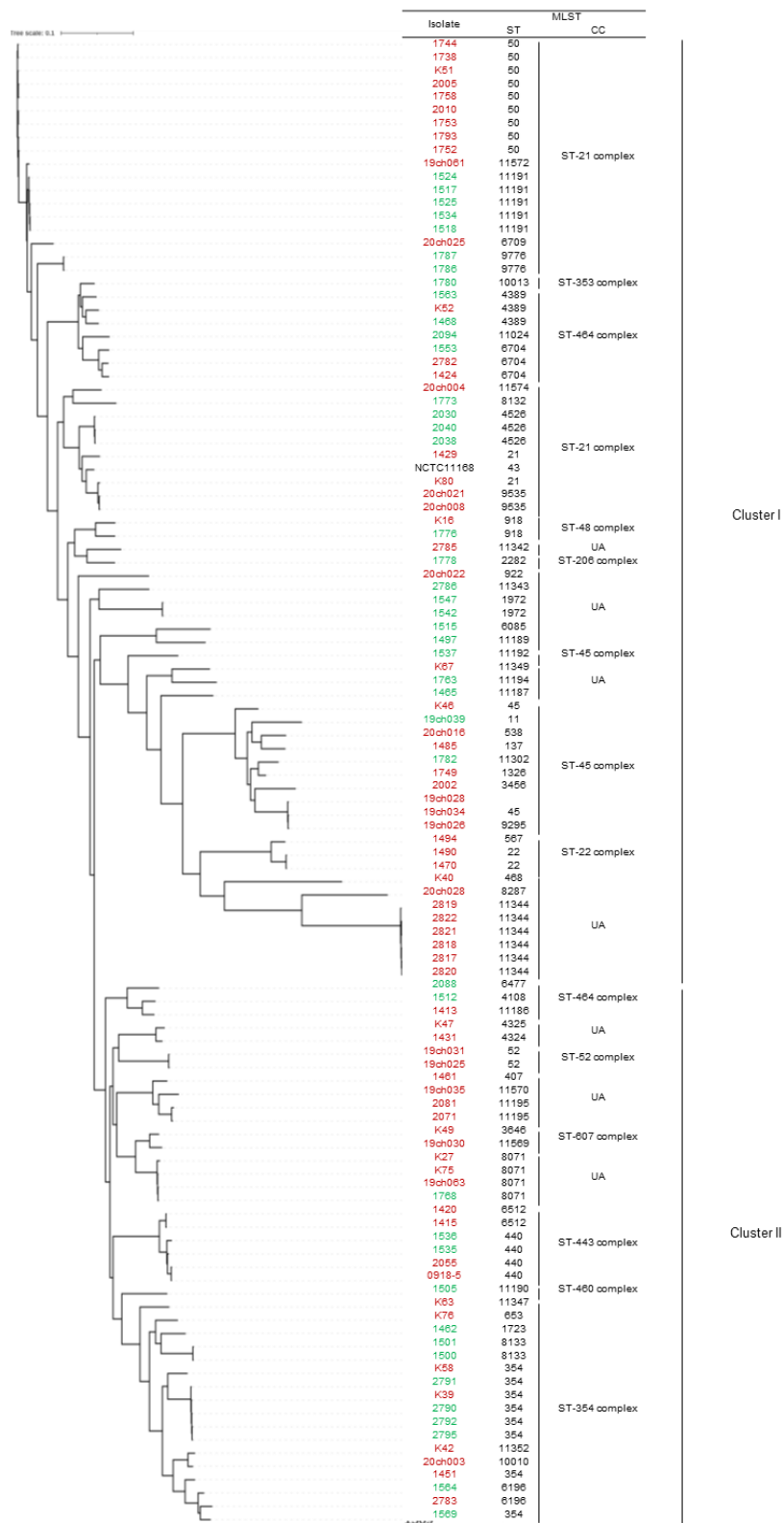


図 3. SNP 配列多型に基づく、*C. jejuni* 株の系統樹。

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。

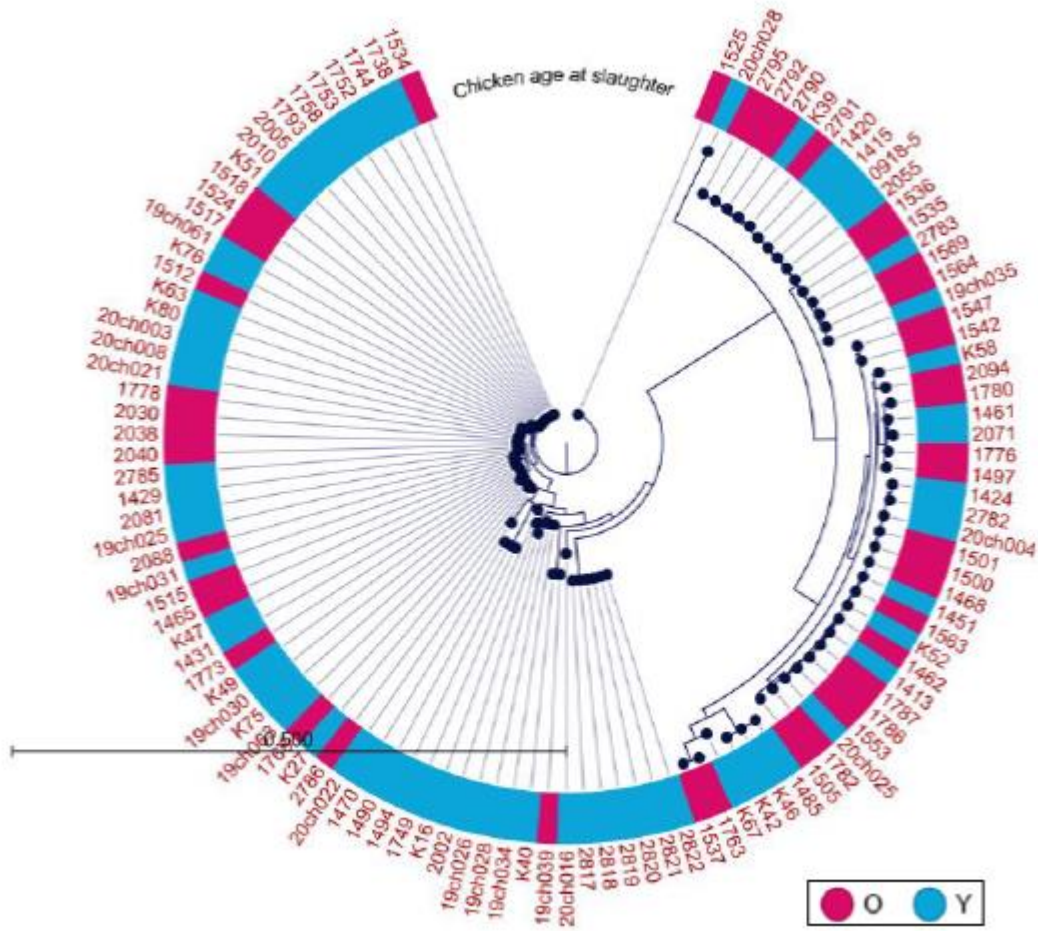


図 4. *porA* 配列多型に基づく系統樹.

O は 75 日齢以上、Y は 75 日齢未満の鶏肉由来株を指す。

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		
ST-45 CC	11			11	1	Y (1)	C
		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		
		ST-464 CC	10	4108	1	O (1)	B
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		
ST-443 CC	6			440	4	O (2), Y (2)	B, E
		6512	2	Y (2)	B		
ST-22 CC	3	22	2	Y (2)	B		
		567	1	Y (1)	B		
ST-353 CC	3	8133	2	O (2)	B		
		10013	1	O (1)	B		
ST-48 CC	2	918	2	O (1), Y (1)	B, E		
ST-52 CC	2	52	2	Y (2)	C		
ST-460 CC	1	11190	1	O (1)	B		
ST-206 CC	1	2282	1	O (1)	B		
ST-607 CC	2	3646	1	Y (1)	E		
		11569	1	Y (1)	C		
Unassigned	28	407	1	Y (1)	B		
		468	1	Y (1)	E		
		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)							