

令和3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）

「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：鶏肉製品等におけるカンピロバクター等の定量的汚染実態データ及び殺菌技術の効果に関するデータの集積を図ることを目的として、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殺菌技術とその殺菌効果に関する研究を令和元年度から開始し、最終年度である今年度は、主にこれまでの成果を補完するための研究を実施した。

①では、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を調査した。鶏モモ肉検体では 15 検体（30%）から検出され、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、カンピロバクターは 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。*Campylobacter jejuni* 計 111 株を対象に whole genome sequencing 解析を行ったところ、multilocus sequence typing（MLST）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、*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が得られた。②では、鶏皮（ムネ皮）について追加調査を実施した。その結果、前年度と今年度で合わせて 125 検体について両試験法で定量値を得ることができ、鶏肝臓と同様、mCCDA 法と高い相関性（ $R^2=0.96$ ）を示す結果が得られ、mCCDA 法と同等の結果が得られることを確認できた。③では、前年度に分離されたサルモネラのうち、最も検出頻度の高かった *Salmonella Schwarzengrund* について、分離株の分子遺伝子型別を実施したところ、つみれや肉団子などの鶏肉加工品から分離された *S. Schwarzengrund* 20 菌株は、菌株間で大きな遺伝的な相違は認められず、また、MLST 型は、国産鶏肉などから高頻度に分離される *S. Schwarzengrund* の同一（ST241）であった。以上の結果から、鶏肉加工品のサルモネラ汚染は、原料となる鶏肉由来である可能性が高く、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、焼き鳥モモ串を検体として、高圧処理（500 MPa で 10 分間）後に加熱調理（200℃で 5 分間）をした場合のサルモネラ属菌及びカンピロバクターの低減効果を調べた結果、定性試験法で検出下限値未満となり、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り、加熱不十分な鶏肉の喫食による食中毒の発生予防策として実用的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：

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

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

林谷秀樹 東京農工大学

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

筒浦さとみ 新潟大学

西海理之 新潟大学

鈴木穂高 茨城大学

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。

最終年度である今年度は、これまでの研究成果の補完・発展を目的とした調査研究を実施した。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では、更なる定量的調査を実施するとともに分離菌株の遺伝子学的手法を用いた疫学分析を行った。畜産食品における微生物迅速試験法に関する研究では、鶏皮（ムネ皮）を検体として自動生菌数測定装置を用いた迅速定量試験法（TEMPO 法）の有用性評価を追加実施するとともに、食鳥処理場包装品等を検体として定量的汚染実態調査を実施した。さらに、腐敗菌等の増殖を抑制することで消費期限を延長させることができるとして、米国や欧州等において牛肉や豚肉の販売形態として広く利用されているガス置換包装が、最近我が国でも利用されるようになってきたことから、ガス置換包装によるカンピロバクター及び衛生指標菌（一般生菌及び腸内細菌科菌群）の動態について調査した。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では、鶏肉加工製品から分離されるサルモネラの由来を推定するため、最も多く分離された

血清型である *S. Schwarzengrund* について遺伝子学的手法を用いた疫学分析を行った。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では、高圧処理と加熱調理の組合せによる殺菌効果及び品質変化について追加調査した。

B. 研究方法

1. 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

1.1. 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。

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100 mLの緩衝ペプトン水 (BPW) 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。

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 (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。

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。本研究では卸売時の包装形態として一般的である2kg包装の鶏モモ肉製品を対象として選定し、食鳥処理場及び鶏種 (銘柄) の情報とあわせて入手した。

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. 検体入手

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。

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。

2.2. カンピロバクター定量試験

鶏肝臓では、検体（1 製品につき肝臓 5 個を個別に検査）を 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 3~4 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℃、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、緩衝ペプトン水（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、MLST と薬剤感受性試験を実施した。

2.3. 一般生菌及び腸内細菌科菌群の定量試験

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、リン酸緩衝液（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 ± 2 時間培養（37℃）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 ± 2 時間培養後（37℃）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. 供試材料

前年度に国産鶏肉を原材料とした鶏肉加工品 95 検体から分離された *S. Schwarzengrund* 20 株を供試菌株とした。また、鶏肉加工品の汚染源を推定するため、2021 年に国産鶏肉から分離された *S. Schwarzengrund* 10 株（北海道産及び東北産）も供試した（MLST のみ）。

3.2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

アガロースプラグの作成は、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 μ g/mL になるよう添加した。培養菌液 1mL を 15,000rpm で 5 分間遠心後、上清を捨て、Cell Suspension Buffer (Bio-Rad) 50 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ g に対し制限酵素 Not I (タカラバイオ) を 1.5 μ L 含むように調整した反応液の中に入れ、37°Cで 1 晩反応させた。その後、Loading buffer (タカラバイオ) 3 μ 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 Bio-tech ltd., Cambridge, England) のウェルに、作成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 つしか変わらないものは同じ PFGE パターンと判断した。

3.3. 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

高圧処理の細菌低減実験に用いる焼き鳥モモ串は、神奈川県内及び東京都内の鶏肉専門店で購入し、冷蔵状態で運搬した。検体は個別に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。検体数は、高圧処理、加熱調理ともに行わない条件では2検体、その他の条件では5検体を用いた。

4.2. 高圧処理

二重包装済みの検体を Dr. CHEF（神戸製鋼所）を用いて、300 MPa～500 MPa で10分間の高圧処理を行った。処理時の温度は室温で行った。

4.3. 加熱調理

加熱調理用オーブンは Cook Evario（ホシザキ）を使用した。加熱調理前の処理としての高圧処理効果を調べるため、前年度の検討で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℃で5分間を用いた。予熱を行い、200℃に達したところで検体をオーブンに入れ、200℃で5分間の加熱調理を行った。調理終了後はただちに検体をオーブンから出して、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。

4.4. 菌数測定

検体 10 g に 90 mL の滅菌緩衝ペプトン水（BPW、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

要に応じてリン酸緩衝液（スリーエムジャパン）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®AC（ビオメリュージャパン）を用い、35℃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®EB（ビオメリュージャパン）を用い、35℃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®CAM（ビオメリュージャパン）を用い、42℃で48時間微好気培養後に菌数測定を行った。サルモネラ属菌の定性試験は、定量試験で調製した10倍乳剤を37℃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 10 g を CE250 培地に懸濁し、42℃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。

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。

5.6. 統計処理

高圧処理の有無による加熱調理後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。

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. 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

鶏モモ肉検体では15検体（30.0%）から

対象菌が検出され、平均値は $1.08 \pm 1.06 \log_{10}$ CFU/g、最大値は $4.04 \log_{10}$ CFU/gであった。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。

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。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。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。

1.2. 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検体の鶏もも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。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。

1.3. *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 (CC) 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。

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. 鶏皮 (ムネ皮) における TEMPO 法の同等性

供試した計 154 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、90 検体では両試験法でカンピロバクターが検出されず、6 検体ではどちらかの試験法のみで検出され、58 検体では両試験法で検出された。1 試験法のみ検出された検体の内訳については、5 検体では TEMPO 法のみ検出され、残りの 1 検体では ISO 法のみ検出されたが、いずれも $0.32 \log_{10}$ CFU/mL 以下の低汚染検体であった。両試験法で定量値が得られた昨年度の 67 検体と今年度の 58 検体の合計 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。

2.2. 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 (表 2)。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。

2.3. 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ず、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. 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。

3.2. 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。また、国産鶏肉（北海道産及び東北産）由来の10株についても、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. 加熱前処理としての高圧処理の焼き鳥における衛生指標菌及び食中毒菌の低減効果

4.1.1. 300 MPa で 10 分間の高圧処理による低減効果

前年度までの研究で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分間の高圧処理を実施したのち、200°C5分の加熱調理を行った。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 log₁₀ CFU/g（平均値 3.17±0.85 log₁₀ CFU/g）となり、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 log₁₀ 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。カンピロバクターについては、高圧処理後に加熱調理を行った場合でも、定性試験法で5検体中1検体が陽性となった。サルモネラも、高圧処理後に加熱調理を行っても、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。

4.1.2. 400 MPa で 10 分間の高圧処理による低減効果

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。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–1.65 log CFU/g（平均値 0.84±0.80 log₁₀ 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。サルモネラは、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。一方、カンピロバクターは、高圧処理後に加熱調理を行った5検体のうち1検体が陽性であったことから、

400 MPa の高圧処理でも、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。

4.1.3. 500 MPa で 10 分間の高圧処理による低減効果

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。5 回のうち 3 回で、高圧処理後に加熱調理を行った検体の一部から一般生菌が検出されたものの、腸内細菌科菌群、カンピロバクター及びサルモネラは検出されなかった。このことから、前処理として 500 MPa で 10 分間の高圧処理には、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。

4.2. 高圧処理後の加熱調理が焼き鳥の肉質変化に及ぼす影響

加熱調理前の食中毒菌低減処理として効果がみられた 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。本調査を 5 回繰り返した。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かったが、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みられなかった。

D. 考察

欧州では 2018 年から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

log₁₀ 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 log₁₀ 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 月から本格施行され、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（一般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、食鳥処理段階における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 log₁₀ 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。

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り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における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。

前年度で鶏肝臓、今年度では、鶏皮 (ムネ皮) においても mCCDA 法と相関性の高

い ($R^2=0.96$) の定量値を得ることができ、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。

また、鶏肉製品販売形態に関し、低価格化、差別化及び品質確保の容易さ等から、食鳥処理場包装品が店頭販売されるケースが増加しており、当該製品を検体とすることで、食鳥処理場以降の交差汚染の影響なく、全国規模のカンピロバクターの疫学調査を実施することが容易となった。そこで、2021年4月-2021年12月の間に当該製品を検体として調査したところ、上述の調査と同様、カンピロバクター検出率には季節性及び地域性が認められた。鶏肉製品のカンピロバクター汚染率における季節性及び地域性は、肉用鶏群のカンピロバクター保有状況のデータとよく符合しており、カンピロバクター保有鶏群が食鳥処理場で食鳥処理されることで鶏肉がカンピロバクターに汚染される結果、市中にカンピロバクター汚染鶏肉が流通していることを示している。

例年カンピロバクター食中毒事件の報告数が多い6-10月におけるカンピロバクター検出率は4割超（特に、西日本では約7割）であり、この期間における鶏肉のカンピロバクター汚染率を低減させることがカンピロバクター食中毒の低減に効果があると考えられる。汚染菌数については、食鳥処理場間で違いが認められ、高汚染鶏肉 ($2.0 \log_{10}$ 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から、このような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強化することが重要であると考えられる。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入手し、詳細に比較することで、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。

さらに、分離株の性状解析 (MLST 及び薬剤感受性試験) により、食鳥処理場及び地域により分布しているカンピロバクターを特徴づけられる可能性があることが判明した。また、上位の分離株は、人のカンピロバクター感染事例からも分離されており、今回の性状解析によっても国産鶏肉がカンピロバクター食中毒の原因となっていると示唆された。これらの結果から、分離株の性状をモニタリングすることは、食中毒事件発生時の原因究明に役立つ可能性があると考えられる。

鶏肉販売時の包装形態として、現在、含気包装品 (トレーパック品) 及び真空包装品が主流であるが、スーパー等の一部の量販店でガス置換包装品を見かけるようになった。しかしながら、実際に販売されている製品にガス組成に関する記載はなく、表示からガス組成を知ることはできない。今回、協力の得られた2社のうち、A社のガス組成は酸素80%に二酸化炭素20% (酸素充填品)、B社のガス組成は窒素70%に二酸化炭素30% (窒素充填品) であったが、ガス組成の開示を拒否した鶏肉生産者もあるため、海外で利用されているものと類似していると推定されるものの、ガス組成の実態は不明である。

今回、調査できたガス組成は、どちらも海外でも使用されているものであり、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。

両社とも、自家試験成績に基づき、消費期限を2日間（温度条件や鶏肉の部位により異なるが、通常5日間であれば7日間、通常7日間であれば9日間）延長しているとのことであり、また、通常品と菌数の差が大きくなるのは、包装4-5日後からであるとのことであった。今回、製品中で増殖することがないと考えられるカンピロバクターを主な調査対象としたため、包装3日以降の調査を実施しなかったが、製品中で増殖する可能性があるサルモネラ等の病原細菌や衛生指標菌の動態を明らかにするためには、ガス置換包装によって期待される消費期限以降についても調査する必要がある。

鶏肉加工品から最も高い頻度で分離された*S. Schwarzengrund*は、検体の由来は異なるにも関わらず、PFGEおよびMLSTによる分子遺伝子型別において同じであった。*S. Schwarzengrund*は、2000年頃から、九州地方のブロイラーから分離され、その後、これら鶏の国内移動に伴い、東北地方にまで分布が拡大していることが確認されている。今回、鶏肉加工品から分離された*S. Schwarzengrund*20菌株のMLSTタイプが、日本のブロイラー鶏から特異的に分離される本菌のMLSTタイプ（ST241）と同じであったことから、つみれや肉団子などの市販鶏肉加工品を汚染するサルモネラは、原料となる鶏肉由来であることが示された。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あると示された。

焼き鳥は加熱調理時に中心まで十分な加熱がなされない事例も起こりやすい食品と考えられるが、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、検出下限値以下に低減することができたことから、食中毒リスクの低減手法として、有用性が高いことが示された。

E. 結論

国内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、季節性及び地域性が認められるものの、年平均は40-50%の範囲にあること、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に対しては、約10%が超過してしまう可能性があることを把握した。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。

カンピロバクター定量的実態調査を行う際には、TEMPO法を用いることで、迅速・効率的に大量の定量データを入手・分析できると考えられる。

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あると考えられる。

高圧処理（500MPa で 10 分間）後に加熱調理（200℃で 5 分間）を行うことで、検出下限値以下に低減することができ、これらの細菌による食中毒リスクの低減手法として利用できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 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 Mar 1;85(3):424-434.

2. 学会発表

2.1. 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（2021 年 9 月）

2.2. 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）.

2.3. 佐々木貴正ら. 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）.

2.4. 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