

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580376

研究課題名（和文）共振型超音波およびマイクロバブル発生装置を用いた食鳥肉の微生物制御技術の開発

研究課題名（英文）Development of an effective treatment for the reduction of *Campylobacter jejuni* on chicken carcasses by resonant ultrasonication and microbubbles

研究代表者

三澤 尚明 (MISAWA NAOAKI)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20229678

研究成果の概要（和文）：鶏はカンピロバクター食中毒の感染源として最も重要視されており、食中毒を防ぐには食鳥処理場で鶏肉の微生物制御が重要となる。本研究では、食鳥肉に対する新しいカンピロバクター制御技術の開発を試みた。食鳥に付着した細菌に対する殺菌効果を促進させるため、高濃度オゾン水処理や真空処理と超音波照射を行った。その結果、カンピロバクターの菌数は処理前の1/10から1/100以下に減少した。

研究成果の概要（英文）：Healthy chickens are considered as reservoirs for campylobacters and the organisms colonize in the intestinal tract. Contamination of chicken carcasses with *C. jejuni* and *C. coli* occurs over the entire skin surface during processing. In this study, an effective treatment for decontaminating campylobacters using naturally contaminated chicken carcasses was developed. The present study showed that combinations of decontamination techniques of chicken carcasses immerse in cetylpyridinium chloride, vacuum, and ultrasonic generator for water resonance, were highly effective to reduce campylobacters on the skins of carcasses with naturally contaminated chickens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：応用獣医学

科研費の分科・細目：畜産学、獣医学、応用獣医学

キーワード：食品、細菌、獣医学、マイクロバブル、超音波

## 1. 研究開始当初の背景

国内での食中毒発生件数が第一位となっているカンピロバクター菌に国産の市販鶏肉の約7割が汚染されている調査結果が出ており、その防除対策が急がれている。国

内外の食鳥処理場における微生物制御（殺菌処理）には次亜塩素酸ナトリウムが使用されているが、器具・器材に対する殺菌効果は認められるものの、食肉に付着した汚

染微生物に対する殺菌効果は低く、病原微生物を制御するための新しい技術開発が強く望まれていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、オゾンマイクロバブル作製技術および共振型超音波照射技術をシーズとして、食鳥肉における新しい微生物制御技術の創出を目指し、食鳥肉の鮮度保持並びに食中毒菌を殺菌するための技術開発を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 食鳥と体：大規模食鳥処理場で処理されたブロイラー中抜き（内臓摘出後）と体及び小規模食鳥処理場で処理された地鶏中抜きと体を用いた。

### (2) 鶏と体表面付着細菌の菌種の解析

皮膚表面に付着している細菌および真菌を定量的に分離培養し、それらの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、そのホモロジー検索に基づいて優勢菌種の同定を行った。

(3) オゾン含有マイクロバブル水を用いた鶏と体の殺菌効果試験

オゾン発生装置にマイクロバブル発生装置を連結させ、水道水中にオゾンを吹き込んだ際の、溶存オゾン濃度を経時的に測定するとともに、*Campylobacter jejuni*、*Salmonella* Enteritidis、*Escherichia coli* O157:H7、*Vibrio parahaemolyticus*、*Bacillus cereus* および *B. subtilis* の芽胞に対する殺菌効果を調べた。さらに殺菌効果に対する有機物の影響を調べるため、オゾン水に鶏血清を添加して同様の試験を実施した。また、オゾン含有マイクロバブル水に処理場の出荷直前の皮付きもも肉を一定時間浸漬させ、皮の表面に付着している一般細菌、大腸菌群及び低温細菌数をそれぞれ定量的に測定した。さらに表面の細菌を遊離させる目的で超音波発生装置を併用した場合の殺菌効果についても実施した。

### (4) 吸引装置および共振型超音波発生装置

を用いた鶏と体の殺菌効果

殺菌剤を満たした真空容器内にブロイラーまたは地鶏の中抜きと体を浸漬させ、0.002HPa（ヘクトパスカル）で10分間吸引後、常圧に戻す操作を3回行うことで脱気とともに薬液の浸透を促進させ、続いて殺菌剤を満たしたステンレス容器内にと体に移して浸漬させ、と体表面の付着細菌の遊離を促進させるため、共振型超音波発生装置（130KHz）により15分間超音波を照射した。使用した殺菌剤の除去を目的として10分間水道水による流水洗浄を行った後、処理前後の胸および背（各3箇所）の皮をストマッカー処理し、最確数（MPN）法にて皮に付着しているカンピロバクター数を定量的に測定した。対照として未処理と体を水道水で処理するだけの処理を行った。

殺菌剤として、塩化セチルピリジニウム（CPC:1000~5000ppm）、次亜塩素酸（100ppm, pH8.7 または 100ppm~200ppm pH5.0）、亜塩素酸（10,000ppm）、フマル酸（1%）、乳酸（5%）、リン酸三Na（0.1~12%）を用い、と体に付着したカンピロバクターに対する殺菌効果を比較した。

### (5) CPCの残留分析法に関する研究

殺菌剤として使用するCPCのと体への残留検査法の確立と、残留を最小限にする洗浄の条件について精査した。

## 4. 研究成果

### (1) 鶏と体表面付着細菌の菌種の解析と付着機構の解析

ブロイラーの皮膚から分離された一般細菌のうち、優勢に付着していたのは、*Rothia* 属、*Staphylococcus* 属及び *Streptococcus* 属菌で、地鶏では *Dermabacter* 属、*Rothia* 属及び *Lactobacillus* 属菌であった。低温細菌は、ブロイラーでは *Chryseobacterium* 属と *Pseudomonas* 属菌が、地鶏では *Pseudomonas*

属と *Acinetobacter* 属菌が優勢に付着していた。真菌は、ブロイラーでは *Asterotremella albida* が、地鶏では *Candida* 属と *Yarrowia* 属菌が優勢であった。

(2) オゾン含有マイクロバブル水を用いた鶏肉の殺菌効果試験

オゾン発生装置を単独で使用した場合と比較して、オゾン発生装置とマイクロバブル発生装置を連結して用いた場合、水温を 5~10°C に維持した場合、30 分後の溶存オゾン濃度は約 2.6 倍であった (図 1)。

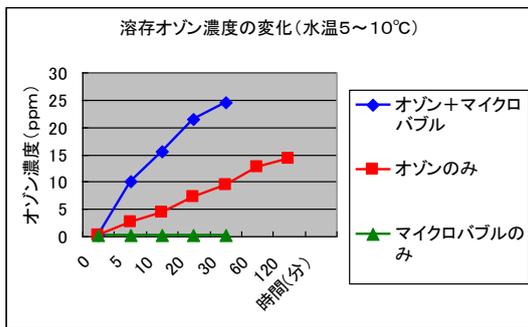


図 1 水温 5~10°C における溶存オゾン濃度の経時変化

各種細菌に対するオゾン含有マイクロバブル水の殺菌効果は、*C. jejuni*、*S. Enteritidis*、*E. coli*0157:H7、*V. parahaemolyticus*、*B. cereus* の芽胞は、1 分後に検出限界値 (10cfu/ml) 以下に殺菌された。一方、マイクロバブル水・蒸留水・水道水では、供試菌全てに対し殺菌効果は見られなかった。

殺菌効果に及ぼす有機物の影響を評価するため、オゾン曝気 30 分後に 0.5% 血清を添加した。その結果、オゾン濃度は著しく減少した (図 2) が、オゾン含有マイクロバブル水では 1 分後に *C. jejuni* を検出限界値以下に殺菌できた (図 3)。

供試した各菌に対する殺菌効果は、オゾン単独の場合でも 1 分以内に検出限界値以下に殺菌することができたが、鶏血清を添加するとオゾン濃度は急激に低下し、殺菌効果は

ほとんど見られなかった。一方、オゾン含有マイクロバブルを用いると血清存在下でも殺菌効果は失われなかった。

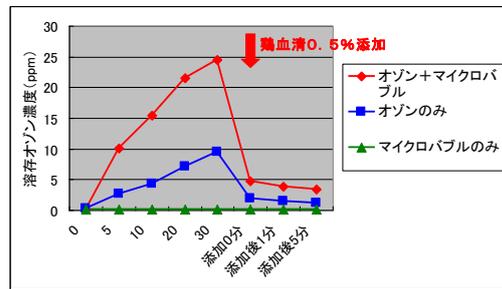


図 2 オゾン濃度に及ぼす鶏血清添加の影響

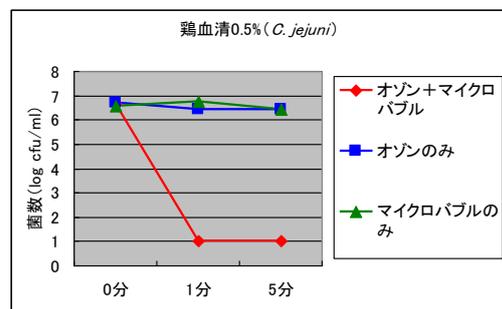


図 3 オゾン含有マイクロバブル水への血清添加時の *C. jejuni* に対する殺菌効果もも肉に付着した細菌に対して最も高い殺菌効果を示したのは、オゾン含有マイクロバブルに超音波処理を組み合わせる方法で、一般生菌数、大腸菌群数および低温細菌数を最大 100 分の 1 にまで減少させることができた (図 4)。

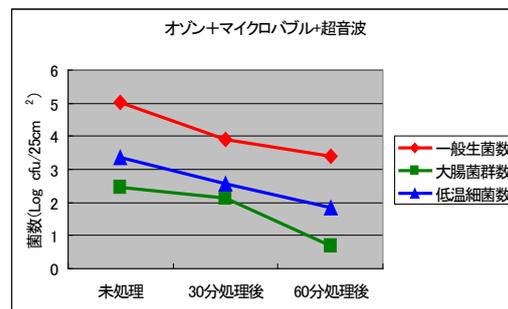


図 4 オゾンマイクロバブル水と超音波併用による鶏モモ肉に対する殺菌効果

(3) 吸引装置および共振型超音波発生装置を用いた鶏と体の殺菌効果  
地鶏に対し、種々の殺菌剤を用いて陰圧処

理を3回行った後に、共振型超音波処理を15分行ったところ、CPC (1,000 ppm)、亜塩素酸 (10,000 ppm)、リン酸三Na (10,000 ppm) およびフマル酸 (10,000 ppm) により、カンピロバクターが検出されないレベルまで殺菌された (図 5-1、5-2)。一方、次亜塩素酸 Na を用いた処理では、pH を酸性にして用いたほうが高い殺菌効果が認められた (図 5-1)。

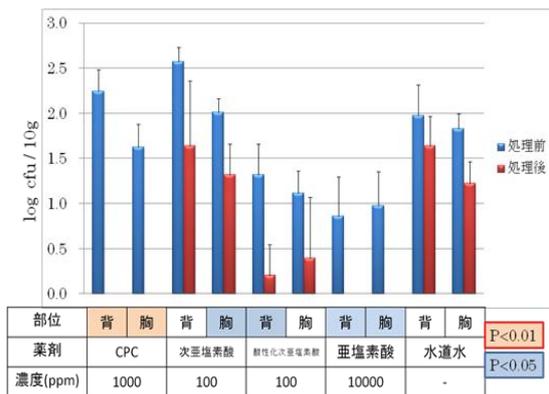


図 5-1 吸引-共振超音波処理による殺菌効果の比較 (地鶏)

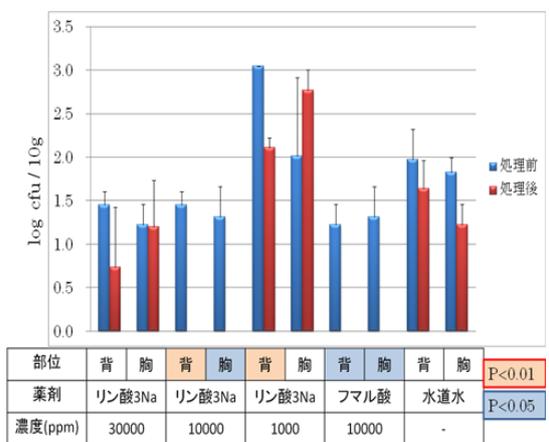


図 5-2 吸引-共振超音波処理による殺菌効果の比較 (地鶏)

ブロイラーに対する殺菌効果を比較すると、地鶏よりも殺菌効果は低い傾向を示した。陰圧処理を3回行った後に、共振型超音波処理を行って、有意な殺菌効果が認められた薬剤は、CPC (1,000 ppm)、リン酸三Na (10,000 ppm) フマル酸 (10,000 ppm) および乳酸 (5%) で

あった (図 6-1、6-2)。

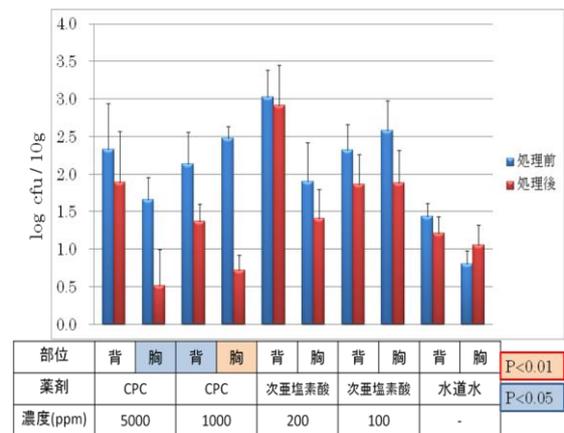


図 6-1 吸引-共振超音波処理による殺菌効果の比較 (ブロイラー)

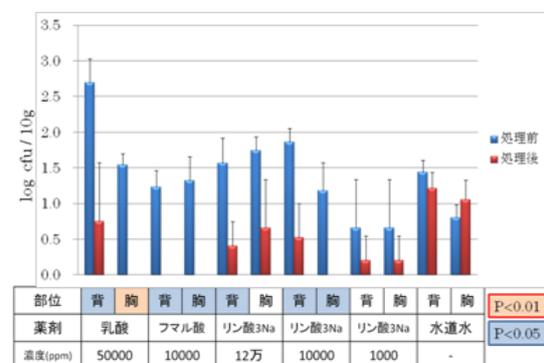


図 6-2 吸引-共振超音波処理による殺菌効果の比較 (ブロイラー)

#### (4) CPC の残留分析法

CPC でと体を殺菌した後に、鶏皮にどの程度の薬剤が残留するかを調べるため、高速液体クロマトグラフィー法による検出法について検討した。親水性相互作用クロマトグラフィー用 (HILIC) カラムを用いて、酢酸アンモニウム・アセトニトリルを移動相としたイソクラティック分析を行ったところ、鶏肉中の CPC の定量下限値は、 $0.125 \mu\text{g/g}$  で、従来の HPLC 測定法に比べて複雑な移動相を使用しない簡便で安定した測定法を確立することができた。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 9 件)

1. Tazumi, A., Xu, J., Han, L., Misawa, N., Moore, J., Millar, C., and Matsuda, M. Correlations between 23S rRNA genes and erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Annals of Microbiology. Ann. Microbiol.*, in press 2012 (査読有り)
  2. Tazumi, A., Negoro, M., Tomiyama, Y., Misawa, N., Itoh, K., Moore, J. E., Millar, B. C., Matsuda, M. Uneven distribution of the *luxS* gene within the genus *Campylobacter*. *Br. J. Biomed. Sci.*, 68: 19-22, 2011 (査読有り)
  3. Porter, S. R., Czaplicki, G., Mainil, J., Horii, Y., Misawa, N. and Saegerman, C. Q fever in Japan: An update review. *Vet. Microbiol.*, 149: 298-306, 2011 (査読有り)
  4. 三澤尚明, 副島潤一郎 超音波を使用したカンピロバクター撃退技術、超音波 TECHNO, 22: 6-9, 2010 (査読無し)
  5. Moe, K. K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, W., Masaaki Nakai, M., and Misawa, N. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *J. Vet. Med. Sci.*, 72: 411-416, 2010 (査読有り)
  6. Yamazaki, W., Kumeda, Y., Misawa, N., Nakaguchi, Y., and Nishibuchi, M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 820-828, 2009 (査読有り)
  7. Tazumi, A., Kakinuma, Y., Misawa, N., Moore, J., Millar, J. B. C., and Matsuda, M. Identification and characterization of intervening sequences within 23S rRNA genes from more than 200 *Campylobacter* isolates from seven species including atypical campylobacters. *BMC Microbiology*, 9: 256 (doi:10.1186/1471-2180-9-256), 2009 (査読有り)
  8. Sekizuka, A., Tazumi, A., Nakanishi, S., Meguro, S., Kakinuma, Y., Misawa, N., Moore, J. E., Millar, B. C., Matsuda, M. Absence of intervening sequences (IVSs) in helix 11 region within 16S rRNA genes among more than 240 isolates of the seven *Campylobacter* species. *Br. J. Biomed. Sci.* 66: 103-106, 2009 (査読有り)
  9. Yamazaki, W., Taguchi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Sakata, J., Inoue, K., Misawa, N. Comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* detection in naturally contaminated chicken meat samples between loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:1597-1603, 2009 (査読有り)
- [学会発表] (計9件)
1. 三澤尚明 食肉の衛生管理についてー食鳥肉におけるカンピロバクターの制御を中心にー 大分県公衆衛生獣医師協議会研修会 (大分市) 平成 22 年 6 月 1 日
  2. 吉本有貴、山崎 渉、三澤尚明 血清中に含まれる *Campylobacter jejuni* の自発凝集活性促進物質の検出 日本獣医学会学術集会 (帯広市) 平成 22 年 9 月 16 日
  3. 三澤尚明、佐々木賢美、山崎 渉、鶏と体のカンピロバクター制御技術の開発、第 150 回日本獣医学会学術集会 (帯広市) 平成 22 年 9 月 16 日
  4. 三澤尚明、佐々木 賢美、吉山 佳世、福井 敬一 オゾン含有マイクロバブル水によるマンゴーの鮮度保持並びに殺菌効果 日本食品微生物学会 (大津市)

平成 22 年 11 月 11 日

5. 新木泰輔、佐々木賢美、山崎 渉、三澤尚明 食鳥肉における新しいカンピロバクター制御技術の開発 日本食品微生物学会（大津市）平成 22 年 11 月 11 日
6. 三澤尚明、新しい概念に基づく食鳥と体のカンピロバクター制御法の開発、第 3 回日本カンピロバクター研究会（宮崎市）平成 22 年 12 月 3 日
7. Misawa, N., Shinki, T., Sasaki, S., Taniguchi, T., Yamazaki, W. Development of an effective decontamination of *Campylobacter* species on chicken carcasses. 16<sup>th</sup> International *Campylobacter*, *Helicobacter*, and related organisms, Vancouver (Canada), 2011. 8. 30
8. 大城昇太郎、新木泰輔、谷口喬子、山崎 渉、三澤尚明 食鳥処理工程におけるブロイラーと体皮膚への *Campylobacter jejuni* の付着能について 第 152 回日本獣医学科学術集会、2011 年 9 月 20 日（大阪府）
9. 浦田彩香、新木泰輔、佐々木賢美、谷口喬子、山崎 渉、三澤尚明 食鳥と体皮膚の各処理工程におけるカンピロバクターの定量検査と冷却前後の羽毛包の観察 日本獣医公衆衛生学会（九州）、2011 年 10 月 30 日（長崎市）

〔図書〕（計 4 件）

1. 三澤尚明、動物の感染症第三版、明石博臣ら編、pp131、近代出版（東京）、2011 年 5 月（分担執筆）
2. 三澤尚明、獣医微生物学 第 3 版、関崎勉、高井伸二、堀本泰介、望月雅美編、pp. 94-97、文永堂出版（東京）、2011 年 8 月（分担執筆）
3. 三澤尚明、新・食肉衛生検査マニュアル 全国食肉衛生検査所協議会編、pp. 202-205、中央法規出版（東京）、2011 年 8 月（分担執筆）

4. 三澤尚明、動物の感染症 第 3 版、明石博臣、小沼操、菊池直哉、後藤義孝、高井伸二、室達勉 編集、pp. 131、近代出版（東京）、2009 年（分担執筆）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：真空及び共振型超音波処理による食品材料における微生物の制御方法及び制御装置

発明者：三澤尚明、副島潤一郎、小山克宏

権利者：宮崎大学、株・カイジョー

種類：特許

番号：特願 2012-507123

出願年月日：2011 年 3 月 18 日

国内外の別：国外（指定国）

名称：口蹄疫ウイルスの包括的検出法

発明者：山崎 渉、三澤尚明

権利者：宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2012-003740

出願年月日：2011 年 1 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/Vet-publichel2/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三澤 尚明 (MISAWA NAOAKI)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20229678