

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：33939

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350156

研究課題名(和文)消費段階におけるカンピロバクターの二次汚染実態とリスク評価

研究課題名(英文)Cross contamination and risk assessment of Campylobacter on consumption stage

研究代表者

岸本 満 (Kishimoto, Michiru)

名古屋学芸大学・管理栄養学部・教授

研究者番号：20454449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：カンピロバクターが消費、調理段階でどのように伝播、生残、増殖するのかその実態を明らかにするため、はじめに食鳥処理施設と小売店の鶏肉108検体を調査、汚染率は小売店段階で1/3以下になるが、内蔵汚染率(41.2%)は肉部の約2倍だった。次に冷蔵庫中の生残については、乾燥、酸素、低pHの影響で死滅する傾向はあったが、ひき肉中及びささみでは4℃で7日間生残、酸素透過性の低いラップやトレイ下でも生残した。また、カンピロバクターの動態を迅速簡便かつ定量的に計測するため、増菌培養とリアルタイムPCR法を組み合わせた「Growth-Realtime定量PCR法」を開発した。

研究成果の概要(英文)：I investigated Campylobacter contamination, transmission and growth on the stage of consumption and cooking. First, 108 chicken meat samples at a slaughterhouse and some supermarkets were examined by Campylobacter spp. isolation using mCCDA culture medium. *C. jejuni* / *coli* were isolated at a slaughterhouse from 9 (90.0%) in 10 samples, and were isolated at some supermarkets from 17 (27.0%) in 63 samples, respectively. At the supermarkets, 13 (41.9%) *C. jejuni* / *coli* were isolated from chicken liver and gizzard, 4 (12.5%) from meat parts. Next, for the survival in a refrigerator, *C. jejuni* tended to decrease on dry, aerobic or low pH condition, but survived 7 days at 4℃ in the minced meat and breast meat. *C. jejuni* tended to survive in low oxygen permeability wrap and plastics tray. Further, in order to analyze the kinetics of Campylobacter quickly, simply and quantitatively, we developed the "Growth Real-time quantitative PCR method" which combines culture and real-time PCR method.

研究分野：食品微生物

キーワード：カンピロバクター 二次汚染 リスクアセスメント

1. 研究開始当初の背景

原料や環境そして人がもつ食中毒菌は二次汚染し生残または増殖して事故を引き起こす。フードチェーン下流は最終防御ラインであり的確にコントロールできなければ食中毒事件が発生する。したがって消費、調理段階で食中毒菌がどのように伝播、生残、増殖するのかその実態を明らかにすることが食中毒予防対策に欠かせない。

内閣府食品安全委員会は2007年「食品により媒介される微生物に関する食品健康影響評価指針」を作成した。食品健康影響評価(=リスク評価)のうち暴露評価では食品を通じてハザードをどの程度摂取しているのか、定性的および定量的な評価を行う。指針によると、消費者段階における暴露評価では“家庭、学校、病院、介護施設、外食産業等での保存方法、調理方法、調理時間、調理温度等による汚染率の変化及び変動、そしてその結果としての、消費者のグループ別の暴露確率と水準”が、評価に必要なデータである。また、2006年に作成された「食品健康影響評価のためのリスクプロファイル」によるとカンピロバクター食中毒は調理の際の手指や器具からの二次汚染、保存温度、調理温度と時間による菌数変化が事故の発生に影響を与える要因である。

Fravaloら¹⁾及びVerhoeff-Bakkenesら²⁾はカンピロバクターがまな板に伝播する頻度及び伝播率を計測したが、国内外とも調理段階における二次汚染や微生物消長を定量的に行った研究は少ない。

2. 研究の目的

細菌性食中毒病因物質のうち事件数でトップのカンピロバクターが調理段階でどのように伝播、生残、増殖するかを、明らかにすることが重要であるという観点から、まずフードチェーン下流(食鳥処理、小売り)における鶏肉のカンピロバクター汚染率を調査した。次に冷蔵庫中でカンピロバクターが生残、死滅する実態をモデル実験で明らかにした。さらにカンピロバクターの動態を定量的に解析、計測するためPCR法を用いた迅速簡便な新規定量法を開発した。

3. 研究の方法

(1) 鶏肉汚染率

2013年4月から10月に県内食品小売店で購入した鶏肉63検体(内訳:食肉32検体、内臓31検体)、食鳥処理場食肉10検体(内訳:食肉5検体、内臓5検体)、計73検体を供試食品検体とした。カンピロバクターの増菌培養にはFPEブイヨン(エーエムアール)を用いた。また、分離培地はmCCDA培地(日水製薬)を用いた。食品検体を無菌的に25g秤量し、FPEブイヨン225mlで、1分間マステイケートした10倍希釈液を試料原液とした。滅菌処理をした広口試薬ボトルに試料原液全量を入れ、37℃24時間振とう培養した。mCCDA培地に増菌培養後の試料0.25mlを、コンラージ棒で塗抹(直接平板塗抹法)、

02:6~12% CO₂:5~8%の微好気条件で42℃で48時間培養(マルチガスインキュベーターSMA-80DS(株)アステック)した後、mCCDA培地上にコロニーを形成したものを簡易同定(グラム染色、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、顕微鏡による形態観察)した。簡易同定でカンピロバクターであると推定された菌株を、マイクロバンク(イワキ(株))で凍結(-80℃)保存した。保存菌株を5%馬血液添加Boltonブイヨン(関東化学(株))に接種後、37~38℃で24時間培養した。これを同定キットapiヘリコ(シスメックス・バイオメリユ(株))に供し、同定確率(%ID)95%以上の株を*Campylobacter jejuni/coli*と判定した。

(2) 冷蔵庫中での生残・死滅実態

Campylobacter jejuni 標準株GTC00259を伝播、汚染菌としてモデル実験に使用した。

冷蔵庫環境(4℃)での生残モデル

1) 鶏むねひき肉:市販の鶏むねひき肉150gに増菌培養した*C. jejuni*の10²倍希釈溶液1mlを一滴ずつまわしかけ、マステイケーターバッグの上から手で30秒間激しくもみ合わせたのち、60秒間マステイケーターで混合し均一化させた。その後、6等分(25g×6個)し、4℃で0、1、2、3、5、7日間、密封環境で保存した後、PBSを225ml加え、60秒間マステイケーターで混合し抽出菌液を得た。抽出菌液を段階希釈し、mCCDA寒天培地で生残菌数を測定した。

2) 鶏ささみ:鶏ささみ約25gをシャーレに入れ、増菌培養した*C. jejuni*菌液の10¹倍希釈液をささみ表面に1ml滴下し、4℃、0、1、2、3、5、7日間、開放環境で保存後、PBSを225ml加えマステイケーターで60秒間混合したのち、mCCDA寒天培地を用いて生残菌数を測定した。

冷蔵庫環境(4℃及び10℃)の生残モデル

各種食品(キャベツ、ポテトサラダ、マッシュポテト、牛乳、カルピス、りんご、オレンジ)25gに、*C. jejuni*菌液の10¹倍希釈液を0.2ml添加した後、4℃ないし10℃で0、1、2、3日間、開放環境で保存した後PBSを225ml加え、マステイケーターで60秒間混合した抽出菌液を得た。抽出菌液を段階希釈し、mCCDA寒天培地を用いて生残菌数を測定した。

冷蔵庫環境(4℃)の生残モデル(包材)

4cm×5cmに切断した各種包材(ラップフィルム(ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリエチレン)、トレイ容器(発砲スチロール、ポリプロピレン))を滅菌シャーレに置き、シャーレ表面と各種包材の接触面に*C. jejuni*菌液の10¹倍希釈液を0.2ml注入し、4℃ないし10℃で0、1、2、3日間、開放環境で保存した後、*C. jejuni*を添加した範囲が完全にPBSに浸かるようにPBSを20ml注ぎ、1分間手で混釈し抽出菌液を得た。抽出菌液を段階希釈し、mCCDA寒天培地を用いて生残菌数を測定した。

(3) 新規定量法の開発

菌液調製：-80 保存したカンピロバクター標準株（前出）をプレストン培地 10ml に接種し 37、24 時間増菌培養した（増菌培養液）。

DNA 抽出：DNA 抽出は熱抽出法を用いた。菌液 1ml を 1.5ml マイクロチューブに入れ、サーモアルミバスで 100、10 分間加熱後 2 分間氷上で冷却、遠心分離（6800×g:8700rpm, 5分, 3）後、上清 0.6ml を別の 1.5ml マイクロチューブ入れ -20 で保存した。

リアルタイム PCR：SYBR®Green を用いたインターカレーター法で行った。SYBR®Spremic Ex Taq TM（TaKaRa）を使用し、プライマーは hipO 遺伝子を標的に設計されたプライマーを用いた。PCR 反応はリアルタイム PCR 装置、TP700（TaKaRa）を用い、Software Vaersion 5.00 で実験データを解析した。プライマーは Forward：CCTATGCTTACAACCTGCTGA、Reverse：CGATGATGGCTTCTTCGG で、反応液は SYBR®Spremic Ex Taq TM（×1）10μl、Primer F/R100μM 各 0.2μl、DW 5.6μl、DNA サンプル 4μl で合計 20μl である。反応条件は初期変性 95（60 秒）のあと熱変性 95（8 秒）アニーリング 60（10 秒）伸長反応 72（20 秒）を 45 サイクル、そして、融解度分析 5（15 秒）60（30 秒）95（15 秒）を 1 サイクル行った。

培養法による菌数測定：*C. jejuni* を含む菌液は PBS で段階希釈後、mCCDA 寒天培地に 0.2ml 接種しコンラージ棒で塗抹して微好気条件（O₂:6%, CO₂:11%, N₂:83%）で 42、48 時間培養後、コロニーカウントにて菌数測定した。

検量線の作成：増菌培養液をプレストン培地で 10⁵~10⁸ 倍希釈したのち 37 で、8,12,16,20,24 時間培養し、PBS で段階希釈した菌液を DNA 抽出、本リアルタイム PCR 法に供し Ct 値及び T_m 値を計測した。同時に各菌液は培養法により菌数測定した。培養法で得られた各菌液の濃度と Ct 値より分布図を作成し、最小二乗法で近似直線を描き検量線回帰式を求めた。

プレストン培地成分の PCR 反応への影響：増菌培養液及び増菌培養液を PBS で段階希釈した菌液を DNA 抽出、本リアルタイム PCR 法に供し、Ct 値及び T_m 値を計測した。同時に、増菌培養液は培養法により菌数測定した。さらに増菌培養液をプレストン培地で段階希釈した菌液とそれらを PBS で 10 倍希釈した菌液を調製し、同じ菌液濃度だが培地成分濃度の異なる菌液を調製した。これらの菌液を DNA 抽出、本リアルタイム PCR に供し Ct 値及び T_m 値を計測し、プレストン培地成分の PCR 反応への影響を評価した。

増菌曲線の作成：増菌培養液をプレストン培地で段階希釈し初発菌数として 10⁰~10³cfu/ml の菌液を調製し、それぞれ 37 で 0,4,8,12,16,20,24 時間培養した。培養後の菌液濃度は培養法により測定した（系列）

また、食品成分が増菌に影響を及ぼす可能性を調べるため、鶏肉 25g と増菌培養液 10ml に PBS215ml を混合した「食品混合菌液」を段階希釈し、系列と同様に 10⁰~10³cfu/ml 菌液を調製し、培養後菌数測定した（系列）。初発菌数ごとに及び系列の増菌曲線を作成し、各培養時間の初発菌数と増菌後菌数より相関図を作成し、最小二乗法で近似曲線を描き、増菌曲線相関回帰式を求めた。

菌液添加試験：増菌培養液をプレストン培地で 10³ 倍希釈した菌液 10ml、鶏ささみ 25g 及び PBS215ml を混合した「添加菌液」を調製した。「添加菌液」1ml をプレストン培地 9ml で 10 倍希釈した菌液の濃度を培養法で菌数測定した。さらに、「添加菌数」をプレストン培地で 10 倍希釈した菌液を 37、16 時間培養後 PBS で 10 倍希釈し、DNA 抽出、本リアルタイム PCR 法に供し Ct 値を測定し、検量線回帰式及び増菌曲線相関回帰式を用いて菌液濃度を計測した。

4. 研究成果

（1）鶏肉汚染率

小売店由来の 63 検体、食鳥処理場由来の 10 検体で、mCCDA 培地上にコロニーが形成された菌株は小売店由来の 51 株、食鳥処理場由来の 10 株の計 61 株だった。この簡易同定で、*Campylobacter* の可能性が高い菌のうち、復元できなかった 2 株を除く小売店由来 49 株、食鳥処理場由来 10 株を api ヘリコに供した。

凍結保存株 59 株のうち、*C. jejuni* に同定されたのは 20 株（小売店由来 12 株、食鳥処理場由来 8 株）、*C. coli* に同定されたのは 6 株（小売店由来 5 株、食鳥処理場由来 1 株）だった。鶏肉検体のうち、手羽・せせり・むね及びももの部位を“肉部”、砂肝及びレバーの部位を“内臓”に分類したとき、小売店検体では肉部由来 32 株中 4 株が *C. jejuni* で、分離率は 12.5%、内臓由来 31 株中 8 株が *C. jejuni*、5 株が *C. coli* で分離率は 41.9% だった。食鳥処理場検体では肉部由来 5 株中 4 株が *C. jejuni*、1 株が *C. coli* で分離率は 100.0%、内臓由来 5 株中 4 株が *C. jejuni* で分離率は 80.0% だった。さらに、部位別では小売店の場合、レバー・砂肝・もも・むねから、食鳥処理場の場合、レバー・砂肝・もも・ささみから *C. jejuni/coli* が分離された。また、小売店別では、A 店より 8 株、B・C・D 店よりそれぞれ 3 株、E・F 店からはゼロだった。

（2）冷蔵庫中での生残・死滅実態

冷蔵環境(4)の生残

鶏むねひき肉及び鶏ささみとも緩やかに減少し 7 日目で鶏むねひき肉で平均 0.45log/25g、鶏ささみで平均 0.22log/25g の減少がみられた。*C. jejuni* は乾燥には極めて弱い。鶏むねひき肉より鶏ささみでより多くの *C. jejuni* が生残したが、鶏むねひき肉はその性状により表面積が大きいため水分蒸発が顕著で乾燥したことにより、より多く

死滅したと考えられた。

冷蔵環境(4 及び 10)での生残

1) 野菜(千切りキャベツ、角切りキャベツ) : 千切りではキャベツ切片間の空隙が広く、空気(酸素)に触れる面積が大きいことから乾燥しやすく角切りより生残しにくい環境だったと考えられた。いずれの切り方でも 10 より 4 で多くの菌が生残したが、千切りでは 10 のとき 2 日目に菌数が大幅に減少した。角切りでは温度によって減少傾向に差はなかった。千切りは水分量、酸素濃度、温度などの条件が *C. jejuni* の生存に影響し生残しにくかったと考えられた。

2) 惣菜(ポテトサラダ、マッシュポテト) : 4、10 とともにポテトサラダよりマッシュポテトが菌数減少が大きかった。ポテトサラダには調味料の油分が保水性を高めたり、野菜由来の水分が多く含まれているため *C. jejuni* が生残しやすかったと考えられた。しかし野菜、飲料、果物と比較すると減少量は $0.50 \sim 1.04 \log/25g$ と低く、ポテトに加えられた調味料や野菜が大きく生残に寄与したとは言い難い。

3) 飲料(カルピス、牛乳) : カルピスで 4、10 とともに 1 日目に菌数は 0 になった(カルピス : pH3.8)。一方、牛乳の pH は $6.4 \sim 7.2$ で低 pH による影響を受けず 4、10 で少なくとも 3 日間生残することがわかった。酸性飲料以外では *C. jejuni* の二次汚染リスクは大きい。

4) 果物(オレンジ、リンゴ) : オレンジでは 4、10 とともに同様に菌数減少したが、4 のとき 1 日目で平均 $1.33 \log/25g$ 減少したのに対し、10 では 1 日目で $0.27 \log/25g$ 減少、その後 2 日目で $1.62 \log/25g$ 減少ないし菌数は 0 になった。温度が生残や死滅に影響したかは不明だが、3 日目には 4、10 とともに菌数は 0 となった。オレンジの pH は 3.5 でカルピスよりも低い pH だが 2 日目まで生残したのは果肉細胞のすき間で果汁に影響されずに生き延びたか、有機酸(クエン酸)の種類により死滅しにくい傾向があるかもしれない。一方、リンゴの pH は 4.0 で *C. jejuni* が生残できる pH 領域ではないが 4、10 とともに 3 日間生残した。リンゴの果肉断片部にはオレンジのような果汁の漏出が少なく菌液が果汁と接触しなかったこと、そして果肉細胞の間に入り込むことで *C. jejuni* は生残したと考えられた。果物の果肉構造の違いで低 pH でも *C. jejuni* が生残することが示唆されたことから、冷蔵庫内での果物への二次汚染にも留意すべきである。

冷蔵環境(4)の生残(包材)

1) ラップ(ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリエチレン) : 透湿度及び酸素透過度ともに大きいポリ塩化ビニルで著しく菌数減少が見られた。他のラップより透湿度は $5 \sim 12.5$ 倍、酸素透過度は $1.16 \sim 250$ 倍で *C. jejuni* 菌液中の水分がラップフィルムを透過して蒸発し、また空気中の酸素が透過し

て酸素の曝されたことでポリ塩化ビニルラップ内の *C. jejuni* は死滅したと考えられた。

2) 発砲スチロール、ポリプロピレンとも *C. jejuni* は 3 日間生残した。発砲スチロール、ポリプロピレンはラップより素材に厚みがあり水分を通さず、トレイ下に接種した菌液は乾燥しなかった。水分は保持され、酸素にも曝されることがなかったため *C. jejuni* は生残した。冷蔵庫内で容器トレイの方の下に *C. jejuni* を含む鶏肉ドリップなどが付着すると、*C. jejuni* は生残しやすいことがわかった。食肉はじめスーパーマーケットで売られている食材の多くは、発砲スチロール、ポリプロピレンの容器に入って販売されている。家庭の冷蔵庫では容器のまま入れることがほとんどであり *C. jejuni* が生残しやすい環境になっている。

(3) 新規定量法の開発

C. jejuni 菌数未知の試料をプレストン培地で 37、16 時間増菌培養後 PBS で 10 倍希釈し、DNA を熱抽出後本リアルタイム PCR 法に供し Ct 値を得れば、検量線回帰式 (A) 及び、16 時間増菌曲線相関回帰式 (B) を経て未知の試料中の菌数を推定することができると確立した。

(A) 検量線回帰式 :

$$y_1 = -0.2442x_1 + 12.487 \quad (R^2=0.7059)$$

y_1 : 増菌培養後 10 倍希釈菌液濃度 (log cfu/ml)

x_1 : Ct 値

(B) 16 時間増菌曲線相関回帰式 :

$$y_2 = 1.1693x_2 - 4.4514 \quad (R^2=0.9757)$$

y_2 : 初発菌数 (log cfu/ml)

x_2 : 増菌培養後菌液濃度 (log cfu/ml)

$$[x_2 = y_1 + 1]$$

よって、Ct 値から 16 時間増菌前の菌数を推定することができ、試料中の *C. jejuni* 菌濃度が 100cfu/ml でも 16 時間培養で 10^4 cfu/ml まで増菌されるので試料 1g ないし 1ml あたり $1 \sim 9$ cfu の *C. jejuni* が含まれる試料でも定量が可能である。

定量性の限界は 8.7×10^4 cfu/g の *C. jejuni* を含む鶏ささみ試料で、培養法による菌数測定と同等の精度で定量することができたが、それ以上の成果を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

CHIAKI KOJIMA, MICHIRU KISHIMOTO, TAKAYUKI EZAKI ; Distribution of Antimicrobial Resistance in Campylobacter Strains Isolated from Poultry at a Slaughterhouse and Supermarkets in Japan ; Biocontrol Science Vol. 20(2015) No. 3, p.179-184

[学会発表](計 5 件)

1. 冷蔵環境における鶏肉中の Campylobacter

- jejuni の生残に関する研究, 杉山由希子、成田あゆみ、岸本満, 日本家政学会中部支部第 15 回家政学関連院生学生研究発表会, (2015)
2. 薬剤耐性 *Campylobacter jejuni/coli* は増加傾向か?, 小島千明, 岸本満, 日本家政学会中部支部第 14 回家政学関連院生学生発表会, (2014)
3. 調理用手袋を介した二次汚染--モデル実験と細菌伝播率-, 岸本満, 齋藤由美, 田川詞央里, 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会, (2014)
4. 食鳥処理及び市販鶏肉の *Campylobacter jejuni/coli* 汚染実態と食中毒リスク, 小島千明, 岸本満, 駒場新, 江崎孝行, 日本家政学会中部支部第 58 回大会, (2013)
5. 鶏肉由来 *Campylobacter jejuni/coli* のフルオロキノロン系抗菌薬への感受性, 小島千明, 岸本満, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 満 (KISHIMOTO, Michiru)
名古屋学芸大学・管理栄養学部・教授
研究者番号: 20454449