

=原 著=

## 冷凍処理による鶏肉中での カンピロバクター汚染低減効果に関する検討

朝倉 宏<sup>\*1,†</sup>・山本詩織<sup>\*1</sup>・橋 理人<sup>\*1</sup>・  
吉村昌徳<sup>\*1,2</sup>・山本茂貴<sup>\*3</sup>・五十君静信<sup>\*1</sup>

(<sup>\*1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所, <sup>\*2</sup> 日本冷凍食品検査協会関西事業所, <sup>\*3</sup> 東海大学)

(受付: 平成27年4月 3日)

(受理: 平成27年7月30日)

### Studies on Efficacy of Freezing on the Reduction of *Campylobacter jejuni* in Chicken Meat

Hiroshi ASAKURA<sup>\*1,†</sup>, Shiori YAMAMOTO<sup>\*1</sup>, Masato TACHIBANA<sup>\*1</sup>,  
Masanori YOSHIMURA<sup>\*1,2</sup>, Shigeki YAMAMOTO<sup>\*3</sup> and Shizunobu IGIMI<sup>\*1</sup>

(<sup>\*1</sup> National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501;

†Corresponding author)

(<sup>\*2</sup> Japan Frozen Food Association Kansai Branch, 3-2-6 Minatojima  
Minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047)

(<sup>\*3</sup> Tokai University, 3-20-1 Orido, Shimizu-ku, Shizuoka 424-0902)

Here we examined the efficacy of freezing treatment to reduce the survival of *Campylobacter jejuni/coli* in chicken meat. Spike experiments showed approximately 1.9-2.3 log CFU/g reduction of *C. jejuni* NCTC 11168 and 81-176 strains in minced chicken meats following the freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 weeks. This freezing condition also induced significant reduction of bacterial detection ratio in commercially-distributed minced chicken meats that exhibited 40% positivity for *Campylobacter* spp. as natural contamination. Furthermore, crust freezing procedure decreased numbers of *Campylobacter* spp. in chicken meats and offal, compared with those in chilled chicken samples, although indicator bacterial counts did not correlate with the different treatments. Qualitative detection of *Campylobacter* spp. resulted that imported frozen chicken thigh samples showed only 2.2% positivity while domestically-produced chilled samples were 26.7% positive for those bacteria. Together, these data clearly indicated that freezing treatment consecutively reduced survival of the thermophilic *Campylobacter* in chicken meats. Practical application of this treatment would be helpful to control of this pathogen in chicken meats.

**Key words:** *Campylobacter*, chicken meat, freezing, survival

#### 緒 言

国内で発生する食中毒事例の中で、カンピロバクター・ジェジュニ/コリによるものは、事例数が最も多い傾向が近年続いており<sup>1)</sup>、その対策が求められてい

る。本菌は、鶏や牛などの家禽や家畜の腸管内に広く分布しており<sup>4)</sup>、これら食鳥肉・食肉の生産・解体・加工処理・流通・消費過程といったフードチェーンを通じ、ヒトへの感染をあらわす。分子疫学研究の進展に伴い、英国や米国における本食中毒の原因食品としては、鶏肉が最も高い比率で介在することが明らかになりつつある<sup>3, 2)</sup>。わが国においても、同様に食鳥肉はカンピロバクター食中毒の主たる原因食品と目され<sup>1)</sup>、その生産～消費を通じた総合的な制御対策が本食中毒低減を図るう

\*1 158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

\*2 650-0047 神戸市中央区港島南町3-2-6

\*3 424-0902 静岡市清水区折戸3-20-1

えでの最重要課題となっている。

わが国では、食品安全委員会により、2009年に鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ／コリに関する食品健康影響評価書が策定され、各段階での対策案の例示とともに、各手法による汚染リスク低減効果の評価がなされている<sup>15)</sup>。食鳥処理過程における対策例としては、汚染鶏・非汚染鶏の区分処理（予測低減率44.0%）や冷却水の塩素濃度管理の徹底（同21.4%）などが交差汚染の低減に資するものとして挙げられている。一方、国内における食鳥肉生産の管理体制上、前者の実行性は乏しく、現実的な対策としては成立し難い状況にある。また、その下流にあたる調理・喫食段階での対策例としては、一般的な交差汚染の防止に加え、加熱の徹底（生食あるいは加熱不十分な調理の回避）が汚染リスク回避の有効な手段として挙げられており、リスクコミュニケーション活動を通じて、十分な加熱の必要性が消費者に対して啓発されている。しかしながら、わが国や韓国など一部の国・地域では、食鳥肉の生食が食習慣として根づいており、生食用として提供される食鳥肉に対しても一定の対策を検討する必要性が議論されているところである。

本研究では、流通段階における本菌の制御対策として、冷凍処理が海外3カ国（アイスランド、デンマーク、ニュージーランド）において既に導入・運用されていること<sup>2, 22, 23)</sup>、そして馬肉では寄生虫汚染制御のための対策として冷凍処理法が通知・運用されている実態<sup>10)</sup>を踏まえ、冷凍処理を通じた鶏肉中のカンピロバクター生存挙動に関する諸検討を行ったので報告する。

## 材料および方法

### 1. 添加回収試験

#### (1) 検体の調製

都内で市販される冷凍鶏挽肉を購入し、冷凍機器を用いて、20時間・ $-20^{\circ}\text{C}$ にて冷凍処理を行った後、 $4^{\circ}\text{C}$ で自然解凍した。同様の冷凍・解凍処理を再度実施後、検体25 gを1検体として、カンピロバクター・ジェジュニ／コリの定性試験をISO 10272: 2006-1に準じたNIHSJ-02-ST4: 2012<sup>14)</sup>により行い、自然汚染がないことを確認した後、添加回収試験における食品マトリックスとして用いた。なお、当該試験は試料25 gに対し、プレストンブロス(Oxoid)100 mlを用いて $42^{\circ}\text{C}$ で増菌培養後、mCCDA培地(Oxoid)およびスキロー寒天培地(Oxoid)を用いて分離培養を行い、定型的集落を5個釣菌して、鑑別試験を行うものである。

#### (2) 試験方法

本研究では、*C. jejuni* NCTC 11168株および81-176株を野外代表株として用いた。ミューラーヒントンブロス(OXOID)中で16時間、微好気培養を行い、各菌株を鶏挽肉検体25 gに $1.0\text{--}1.1 \times 10^7$  CFU/gとなるよう添加した後、速やかに $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫内で冷凍保存した。0, 1,

2, 5, 7, および14日間冷凍保存後、各5検体を $4^{\circ}\text{C}$ にて4時間自然融解させ、ISO 10272-2: 2006<sup>8)</sup>に従い、定量検出試験を行った。本定量試験では、検体25 gに9倍量の緩衝ペプトン水(BPW)を加えて10倍乳剤を作成した後、同液100  $\mu\text{l}$ をmCCDA培地2枚に塗抹し、 $41.5^{\circ}\text{C}$ で48時間微好気培養を行った。発育集落数を求めたうえで、定型的な5集落を釣菌し、確定試験（形態、運動性、 $25^{\circ}\text{C}$ および $41.5^{\circ}\text{C}$ での増殖試験、ならびにオキシダーゼ試験）に供することで、生存菌数を求めた。また、低菌数接種群の検討にあたっては、上述の2菌株を $1.7\text{--}1.8 \times 10^3$  CFU/gとなるよう、鶏挽肉25 gに接種し、冷凍保存に供した。また、菌株間での冷凍抵抗性の差異を検討するため、鶏肉由来*C. jejuni*計20株<sup>1)</sup>を用いて、上述の高濃度接種群と同様に冷凍保存試験を行い、冷凍2日および7日後の検体における接種菌株の生存菌数を求めた。

#### (3) EMA-PCR法を用いた生存菌の確認

上述の高濃度接種菌添加検体を同様に作成した後、0, 1, 2, 5, 7, 10, 14日間、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて冷凍保存した。保存検体25 gに対し、100 mlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を添加・混和後、同懸濁液1 mlより、Fukushimaらの方法<sup>5)</sup>に準じて、菌体群集を食品残渣より分離した。得られた菌体懸濁液100  $\mu\text{l}$ を各40  $\mu\text{l}$ となるよう2系統に分け、一群はエチジウムモノアザイド(EMA)を主体とする、Viable *Campylobacter* Selection Kit for PCR (タカラバイオ)を用いて、指示書に従ったEMA標識処理を行い、もう一群は15  $\mu\text{l}$ のPBSを加え、無処理群として氷上で保存した。NucleoSpin Tissue XS kit (MACHEREY-NAGEL)を用いて、各群よりDNAを精製した後、同溶液1  $\mu\text{l}$ を鋳型DNAとして、Cycleave<sup>®</sup> PCR *Campylobacter* (*jejuni/coli*) Typing Kit (タカラバイオ)を用いた定量PCR反応に供した。同反応には、LightCycler 480 (ROCHE)を用い、各検体における(EMA標識群定量値/無処理群定量値)より生存率を求めた後、冷凍処理0日目検体における培養菌数(検体へ接種後、速やかに回収し、得られた菌数)を生存率100%と仮定したうえで、各検体の生存菌数を算出した。

### 2. 冷凍処理による鶏挽肉のカンピロバクター汚染の低減効果

市販チルド鶏挽肉5 kgを入手し、検体あたり25 gとして、50検体をNIHSJ-02-ST4: 2012に従って、カンピロバクター定性試験に供した（無処理対照群、Non-frozen control, Fig. 3）。このうち、計5検体を採材し、ISO 10272-2: 2006に従い、カンピロバクター定量検出試験を実施した。その後、同一ロットより、検体あたり25 gとなるよう、滅菌ストマッカー袋に入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$ 下で0, 1, 7日間保存した（各群50検体）。保存後、各検体は $4^{\circ}\text{C}$ で3時間自然解凍させ、NIHSJ-02-ST4: 2012に従って、カンピロバクターの定性検出試験に供した。なお、0日目検体の数値は冷凍前検体からの回収菌数を指してい

る。

### 3. 急速冷凍およびチルド処理を行った検体間での汚染菌数の比較

国内の食鳥処理加工工場にて、食鳥処理後に急速冷凍処理(Crust freezing)あるいはチルド処理を行った同一ロットの鶏部分肉(モモ, ムネ, ササミ, レバー, 砂肝)各500gを500mlのニュートリエントブイヨンNo. 2(OXOID)に懸濁した後, 同懸濁液10ml, 1ml, 0.1mlを100mlのプレストンブロス(ニッセイバイオ)に3本ずつ加え, 42℃で48時間微好気培養した。培養液を白金耳でmCCDA培地に塗布後, 42℃で48時間微好気培養を行い, 各平板より5集落を釣菌し, コロニーPCR法<sup>9)</sup>による確認試験を行った。最終的に, 各検体における汚染菌数は最確数法により求めた。また, 上述の2倍希釈懸濁溶液については, EasySpiral<sup>®</sup>(INTERSCIENCE)を用いて, 100 $\mu$ lずつ標準寒天培地(OXOID), VRBL寒天培地(OXOID), VRBG寒天培地(OXOID)に塗布し, それぞれ35℃, 44℃, 35℃で24時間好気培養を行い, 一般生菌数, 大腸菌群数, 腸内細菌科菌群数を求めた。本試験では, カンピロバクター・指標菌ともに, 各群3検体を試験に供し, 平均値および平均誤差を求め, 群間比較には, *t*-検定を用い, *p*値<0.05を有意差ありと判定した。

### 4. 輸入冷凍および国産チルド鶏肉検体間での比較定性試験

2014年5月~8月の間, 都内で市販される輸入冷凍鶏モモ肉および国産チルド鶏モモ肉(Table 2)を45検体ずつ購入し, 10℃以下で実験室へ搬入し, 速やかにNIH-SJ-02-ST4:2012に従い, カンピロバクター定性検出試験へ供した。なお, 冷凍検体については, 4℃で3時間自然解凍した後, 当該試験に供した。

## 結 果

### 1. 冷凍処理を通じた鶏挽肉中 *C. jejuni* の生存挙動

冷凍処理を通じた, 国産鶏挽肉中における *C. jejuni* NCTC 11168株および81-176株の生存挙動を異なる接種菌数を用いて各群5検体として検討した。高菌数接種群(7.00-7.05対数個/g)における接種菌の生存菌数平均値は, 冷凍1日後で6.77-6.80対数個/g, 7日目には6.07-6.40対数個/gとなり, 14日目には5.91-6.06対数個/gと, 接種菌数に比べて, 検体1gあたり0.99-1.09対数個の減少を示した(Fig. 1A)。低菌数接種群(3.24-3.26対数個/g)における生存菌数は, 冷凍1日後で2.65-2.72対数個/g, 7日後で1.99-2.16対数個/gとなり, 同処理14日後には1.00-1.38対数個/gと, 接種菌数に比べて検体1gあたり1.88-2.24対数個の減少を示した(Fig. 1B)。膜損傷性を指標とするEMA-PCR法により, 高菌数接種群を対象として併せて検討したところ, 冷凍2, 7, 14日後における換算生存菌数はそれぞれ6.58-6.68対数個/g, 6.28-6.40対数個/g, 5.73-5.95対数個/gとなった(Fig.

1C)。以上より, 冷凍処理を通じ, 国産鶏挽肉中において, カンピロバクター・ジェジュニ供試菌株の生存性は経時的に低減することが示された。

### 2. *C. jejuni* 菌株間での冷凍感受性差異

ニワトリ由来 *C. jejuni* 計20菌株を用いて, 冷凍処理を通じた鶏挽肉中の生存性に関する比較を行った。7.23-7.26対数個/gの各菌株を接種後, 冷凍処理に供したところ, 菌株間での冷凍生残性は, 同処理2日で顕れ, P\_0016株が6.64対数個/gの生存菌数を示したのに対し, P\_0052株の生存菌数は5.77対数個/gであった(Fig. 2)。P\_0016株の生存菌数については, 冷凍7日後も6.47対数個/gと, 接種菌数に比べ約0.78対数個/gの低減にとどまった(Fig. 2)。一方, 冷凍7日後に最も顕著な菌数減少を示したP\_0052株の生存菌数は5.26対数個/gと, 接種菌数から約1.96対数個/gの低減を示した(Fig. 2)。以上より, 鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニの生存性は, 冷凍処理を通じ, 菌株間で差異を認めながらも, 経時的な減少傾向を示した。

### 3. 冷凍処理によるカンピロバクター汚染の低減効果

市販チルド鶏挽肉50検体を対象に, カンピロバクター汚染定性試験を実施したところ, 20検体が陽性を示した(陽性率40%)(無処理群=Non-frozen control, Fig. 3)。このうち, 5検体については, 定量試験に供し, 0-46 MPN count/g(平均23.4 MPN counts/g)のカンピロバクター汚染が認められた。当該鶏挽肉検体を対象として, 1日または7日間の冷凍処理を行い, カンピロバクター陽性検体数を定性的に検討したところ, 1日・7日冷凍処理群(各50検体)の陽性検体数は, それぞれ12検体および6検体となった(Fig. 3)。

### 4. 急速冷凍による生残菌数の低減効果

食鳥処理直後に, Crust freezingにより, 表面のみを急速冷凍させた(急速冷凍処理群), またはチルド(10℃以下)状態で処理された(チルド処理群), 同一ロットの食鳥部分肉(モモ, ムネ, ササミ, レバー, 砂肝)について, カンピロバクターおよび衛生指標菌(一般生菌数, 大腸菌群数, 腸内細菌科菌群数)の定量試験を行った。カンピロバクター検出菌数として, チルド処理群では, ムネおよびササミ検体ではそれぞれ0.68 MPN count/gおよび0.27 MPN count/gであり, 他部位(モモ, レバー, 砂肝)は11.00 MPN count/gであった(Table 1)。急速冷凍処理群における同菌数は, ムネ, 砂肝, ササミでそれぞれ0.11 MPN count/g, 0.16 MPN count/g, および0.19 MPN count/gであり, モモおよびレバーにおける菌数は11.00 MPN count/g, 3.10 MPN count/gであった(Table 1)。指標菌数のうち, 一般生菌数は, チルド処理群が3.66-4.78対数個/g(平均値4.21対数個/g)であったのに対し, 急速冷凍処理群では2.76-4.89対数個/g(平均値3.55対数個/g)であった(Table 1)。また, 部位別の比較では, モモ検体における一般生菌数は他部位に比べ高値を示し, ササミおよび砂肝



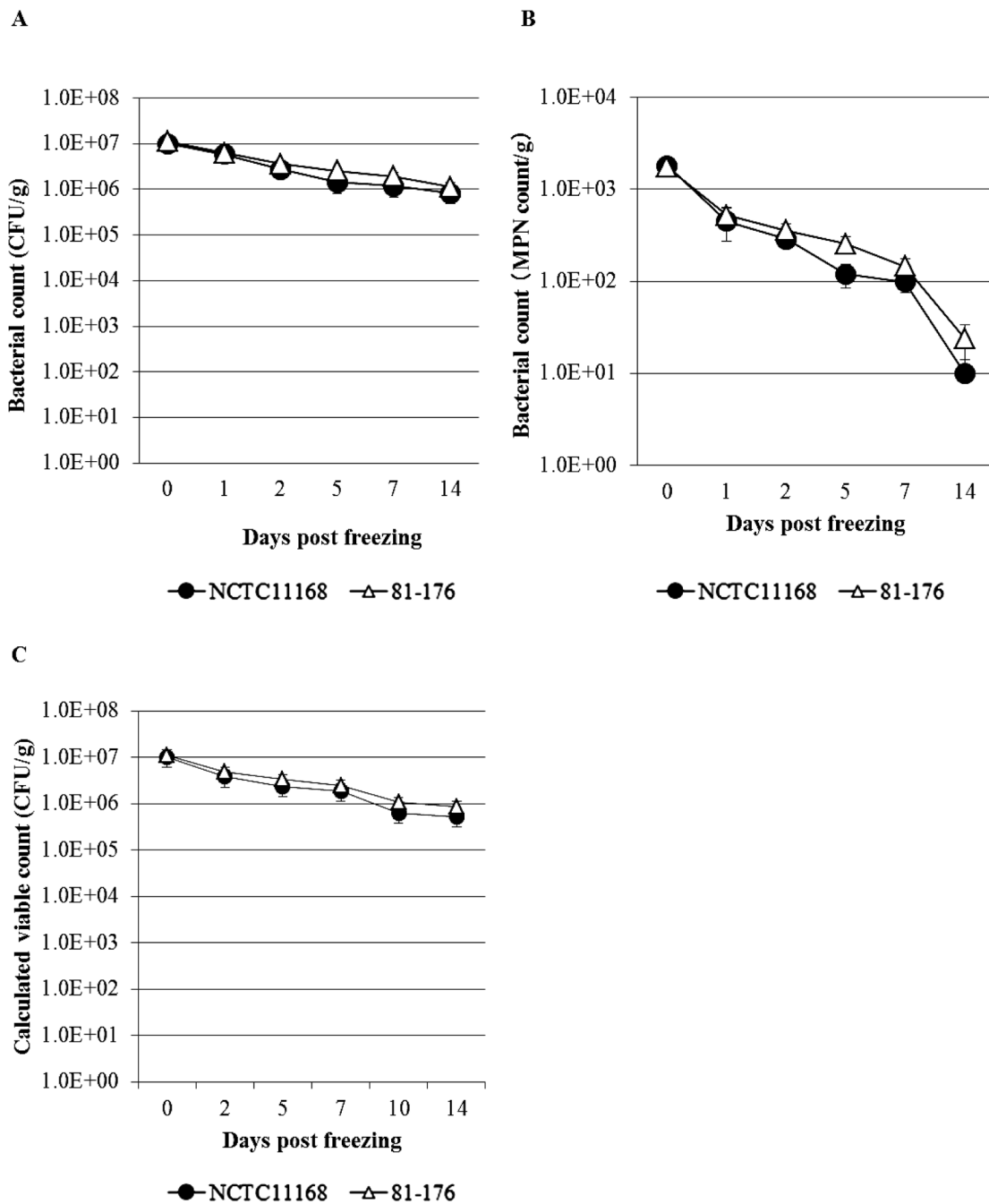


Fig. 1. Survival of *C. jejuni* NCTC11168 and 81-176 strains in minced chicken meats under freezing condition ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Sections A and B represent plate count data and section C represents viability of the spiked *C. jejuni* strains based on the EMA-PCR.

の菌数は低い値であった (Table 1)。大腸菌群数については、チルド処理群が2.80-4.51対数個/g (平均値3.79対数個/g)、急速冷凍処理群では1.92-4.43対数個/g (平均値3.14対数個/g)、腸内細菌科菌群数については、チルド処理群が2.34-4.36対数個/g (平均値3.59対数個/g)、急速冷凍処理群が2.08-4.30対数個/g (平均値3.01対数個/g)を示した (Table 1)。一般生菌数と同様に、大腸菌群数および腸内細菌科菌群数として最も高値を示した部位はモモであり、最も低値を示した部位はササミであった (Table 1)。急速冷凍処理群・チルド処理群の

間において、指標菌数の有意差を認めた部位は砂肝のみであった (太字, Table 1)。指標菌の別では、腸内細菌科菌群数は他指標菌に比べ、冷凍処理による低減効果が低い傾向にあった (Table 1)。

#### 5. 市販輸入冷凍・国産チルド鶏モモ肉におけるカンピロバクター汚染率の比較

2014年5~8月に都内で市販される輸入冷凍鶏モモ肉検体および国産チルド鶏モモ肉検体を対象にカンピロバクター汚染率を定性的に比較した。輸入冷凍検体では、2.2% (1/45検体)の陽性率にとどまり、陽性検体から

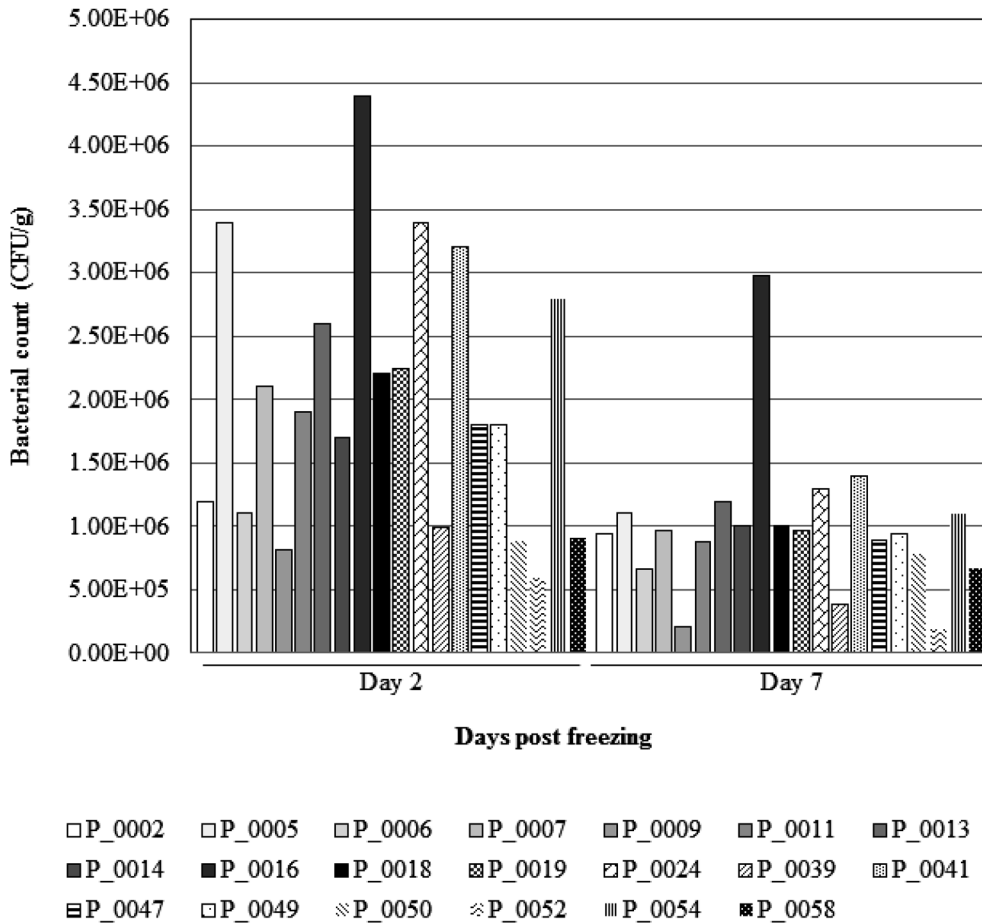


Fig. 2. Strain-to-strain diversity for the survival in minced chicken meats under freezing condition for days 2 and 7. A total of 20 *C. jejuni* strains originated from poultry were used for the comparative analysis. The details of each strain are described in ref. 1.

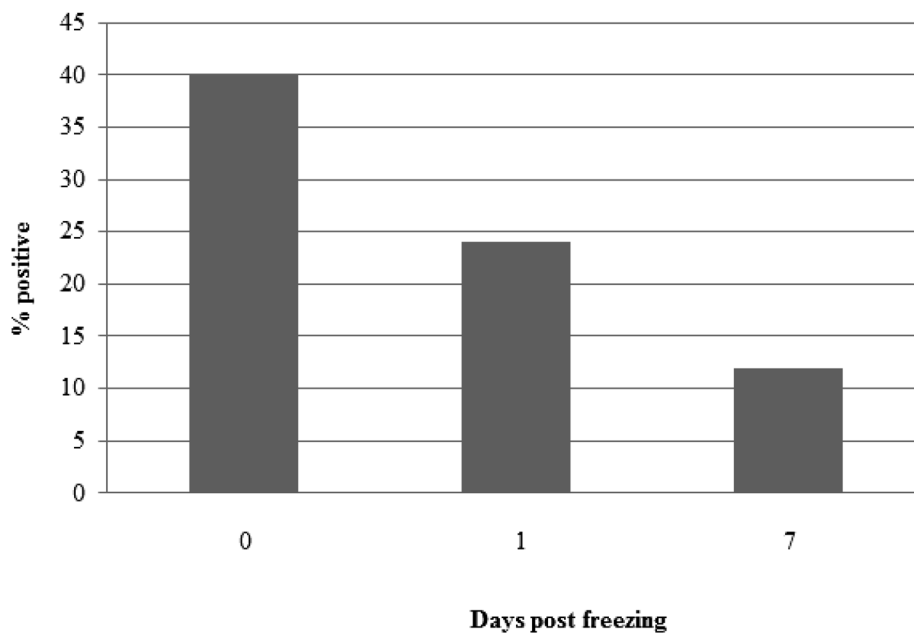


Fig. 3. Detection of *C. jejuni/coli* from naturally-contaminated minced chicken meats in treatment with freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 0 (non-frozen control), 1 and 7 days. Each groups are consisted of 50 samples, respectively. The group of day 0 (non-frozen control) exhibits 40% positivity for *C. jejuni/coli*.

Table 1. Numbers of *Campylobacter jejuni/coli* and indicator bacteria detected from chicken meat and offal treated with or without freezing

Sample	Treatment* <sup>1</sup>	No. <i>C. jejuni/coli</i> (MPN count/g)	Indicator bacterial count (CFU/g)		
			SPC* <sup>2</sup>	Coliforms	Enterobacteriaceae
Thigh	Chilled	11.00	6.0.E+04	2.6.E+04	1.8.E+04
	Frozen	11.00	7.8.E+04	2.7.E+04	2.0.E+04
Breast	Chilled	0.68	2.4.E+04	1.0.E+04	9.3.E+03
	Frozen	0.11	7.1.E+03	4.0.E+03	2.4.E+03
Tender	Chilled	0.27	6.0.E+03	6.3.E+02	2.2.E+02
	Frozen	0.19	6.0.E+02	8.3.E+01	1.2.E+02
Liver	Chilled	11.00	2.8.E+04	3.2.E+04	2.3.E+04
	Frozen	3.10	2.8.E+03	1.5.E+03	1.7.E+03
Gizzard	Chilled	11.00	<b>4.6.E+03</b> * <sup>3</sup>	<b>1.8.E+03</b>	1.1.E+03
	Frozen	0.16	<b>5.8.E+02</b>	<b>3.7.E+02</b>	1.2.E+02

\*<sup>1</sup> Chilled, <10°C; Frozen, crust freezing at <-15°C.\*<sup>2</sup> SPC, standard bacterial count.\*<sup>3</sup> Bold means represent those means statistically differed between chilled- and frozen-samples.Table 2. Prevalence of *C. jejuni/coli* in imported frozen or domestically-produced chilled chicken thighs

Country/Prefecture	No. samples tested	No. samples positive for <i>C. jejuni/coli</i> (% positive)	Isolate
Imported frozen chicken thighs			
Brazil	25	1 (4.0)	<i>C. coli</i>
Thailand	10	0 (0.0)	
USA	10	0 (0.0)	
Sub-total	45	1 (2.2)	<i>C. coli</i>
Domestically-produced chilled chicken thighs			
Gunma	15	4 (26.7)	<i>C. jejuni</i>
Saitama	15	3 (20.0)	<i>C. jejuni</i>
Iwate	15	5 (33.3)	<i>C. jejuni</i>
Sub-total	45	12 (26.7)	<i>C. jejuni</i>
Total	90	13 (14.4)	—

は *C. coli* のみが分離された。一方、国産チルド検体では、26.7% (12/45 検体) の陽性率を示し、陽性検体からはいずれも *C. jejuni* が分離された (Table 2)。

## 考 察

本研究では、鶏肉中のカンピロバクター汚染がヒト食中毒に強い疫学的関連性を示す状況を鑑み、同食鳥肉の流通段階における制御手法の一案として、冷凍処理を取り上げ、その有効性に関する諸検討を行った。

鶏肉中のカンピロバクター汚染に関しては、わが国と同様に米国においても、公衆衛生上、最も危害性の高い食品・病原体の組み合わせとして位置づけられている<sup>3)</sup>。英国では鶏肉中のカンピロバクター汚染低減に有用と目される手法の許容性に関する消費者アンケート結果として、農場での衛生管理の徹底やワクチネーションとともに、冷凍処理がおおむね許容されることが報告されている<sup>13)</sup>。冷凍処理に伴う鶏肉内カンピロバクター汚染低減に関する過去の知見として、数日間の冷凍では、0.91-1.44 対数個の減少が<sup>6, 19, 20)</sup>、3週間の冷凍では1.77-2.18 対数個の減少が認められている<sup>6, 20)</sup>。本研究で

実施した、国産鶏挽肉を用いた添加回収試験においても、それらと同等の汚染低減効果が示され、その有効性が改めて検証された。また、カンピロバクターは、菌株間の遺伝的多様性に富み、一部の表現形質の差異としても顕れることが知られている<sup>18)</sup>。本研究の成績により、カンピロバクターは菌株間で冷凍抵抗性に差異を示すことが明らかになった。一方、抵抗性に多様性を示す菌株のいずれも一定条件での冷凍処理を通じ、確実に生存菌数を低減させることも示された。

わが国で消費される鶏肉のおよそ3分の1は輸入品で占められているが<sup>16)</sup>、過去には輸入冷凍鶏肉が国産チルド鶏肉に比べ、相対的に低い汚染率を示すことが報告されている<sup>17)</sup>。輸入鶏肉の多くが船舶により冷凍状態で輸送される実態を鑑みると、本研究において示された、輸入鶏肉と国産チルド鶏肉検体間での陽性率の顕著な差異は、より長期的な冷凍処理が本菌の鶏肉内汚染制御に有効に機能していることを示唆しているといえよう。一方で、これを実用的に運用するためには、長期的な冷凍保存は望ましいものとは言えず、温度・時間の条件をさらに検討していく必要性が挙げられる。冷凍処理

には、低温ストレスのほか、冷凍・解凍を通じた浸透圧ストレス等の外的要因が介在している。菌株間で認められた冷凍抵抗性の多様性を裏づける科学的根拠はこれまで明らかにされていないが、本菌の低温下における生存には、ポリヌクレオチド・ホスホリラーゼ活性が必要であることが報告されている<sup>7)</sup>。当該酵素活性を担う遺伝子配列の菌株間多様性に関する検討は、本研究において認められた菌株間での冷凍感受性の差異との関連性を探索するうえで有用かもしれない。

また、冷凍処理にかかわるその他の欠点としては、肉質低下に伴う経済的な損失のほか、ドリップの発生に伴う交差汚染も懸念される。国内の食鳥処理加工場の一部では、表面のみを急速冷凍させる「Crust-freezing法」も導入されており、実際に本研究において、急速冷凍処理群がチルド処理群に比べて、モモ検体を除き、低いカンピロバクター汚染菌数を示したことは、上述の欠点を最小限にとどめたいうで、本菌汚染を制御する手法としての応用が期待される。国内での馬肉の流通にあたっては、平成23年6月に、厚生労働省より、 $-20^{\circ}\text{C}$ （中心温度）で48時間以上、 $-30^{\circ}\text{C}$ （中心温度）で36時間以上、 $-40^{\circ}\text{C}$ （中心温度）で18時間以上および急速冷凍装置を用いた場合には、 $-30^{\circ}\text{C}$ （中心温度）18時間以上を保持する冷凍方法、ならびに液体窒素に浸す場合においては、1時間以上保持する方法の導入が寄生虫制御を目的として、通知された<sup>10)</sup>。本研究で明らかにされた、表面急速冷凍法に伴うカンピロバクター汚染低減にかかわる知見を踏まえ、当該手法が検体にもたらず温度制御に関する知見を集積することで、より具体的かつ科学的な条件設定が可能になるとと思われる。

500~800個ともいわれる本菌の最少発症菌数<sup>12)</sup>を鑑みると、食鳥肉の生食は、少なからず感染リスクを伴うことは否定できない。こうした喫食形態にかかわる事項は、消費者の意識向上によるところが大きく、今後リスクコミュニケーション等の啓発活動を持続的に行う必要がある。一方で、多様化する食習慣を考慮するうえでは、生食による感染リスクを低減する手法の開発・導入も今後進めていく必要性があり、本研究の成績は、一つの科学的指標となりうるものと考えられる。

## 要 約

鶏肉におけるカンピロバクター・ジェジュニ/コリ汚染を流通段階で制御するための一手法として、冷凍処理の有効性を検証した。NCTC11168および81-176株を用いた添加回収試験の結果、鶏挽肉における生存性は、 $-20^{\circ}\text{C}$ での2週間の冷凍処理により、最大で約1.9-2.3対数個の減少を認めた。40%の自然汚染率をあらわす鶏挽肉を同上温度での冷凍処理に供したところ、汚染率は1日後には半減し、一週間後にはさらにおよそ半減した。急速冷凍処理(Crust freezing)を行った食鳥部分肉(ムネ・ササミ・レバー・砂肝)は、チルド処理群に比べ

て、相対的に低いカンピロバクター汚染菌数を示した。しかし、モモ肉ではその差異は認められなかった。輸入冷凍鶏肉の本菌汚染率は、2.2% (1/45検体)と、国産チルド鶏肉検体の陽性率(26.7%, 12/45検体)に比べて顕著に低い値を示した。以上の成績より、冷凍処理は、鶏肉におけるカンピロバクター汚染を低減する一手法であることが示された。

## 文 献

- 1) Asakura, H., Brüggemann, H., Sheppard, S. K., Ekawa, T., Meyer, T. F., *et al.*: Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. *PLoS One*, **7**, e48394 (2012).
- 2) Baker, M. Wilson, N., Ikram, R., Chambers, S., Shoemack, P., *et al.*: Regulation of chicken contamination is urgently needed to control New Zealand's serious campylobacteriosis epidemic. *N. Z. Med. J.*, **119**, U2264 (2006).
- 3) Batz, M. B., Hoffmann, S. and Morris, J. G. Jr.: Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *J. Food Prot.*, **75**, 1278-1291 (2012).
- 4) Epps, S. V. R., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C., *et al.*: Foodborne *Campylobacter*: Infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 6292-6304 (2013).
- 5) Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R. and Fujiwara, S.: Rapid separation and concentration of foodborne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 92-100 (2007).
- 6) Georgsson, F., Thornorkelsson, A. E., Geirsdóttir, M., Reiersen, J. and Stern, N. J.: The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiol.*, **23**, 677-683 (2006).
- 7) Haddad, N., Burns, C. M., Bolla, J. M., Prévost, H., Fédérighi, M., *et al.*: Long-term survival of *Campylobacter jejuni* at low temperatures is dependent on polynucleotide phosphorylase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7310-7318 (2009).
- 8) International Organization for Standardization (ISO). ISO/TS 10272-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.—Part 2: Colony-count technique. ISO, Geneva, Switzerland (2006).
- 9) Klena, J. D., Parker, C. T., Knibb, K., Ibbitt, J. C., Devane, P. M., *et al.*: Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5549-5557 (2004).
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について。平成23年6月17日, 食安発0617第3号(2011). <http://www.>

- mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110617\_02.pdf
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課: 食中毒統計資料. [http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html)
  - 12) Kothary, M. H. and Babu, U. S.: Infective dose of food-borne pathogens in volunteers: A review. *J. Food Safety*, **21**, 49–68 (2001).
  - 13) MacRitchie, L. A., Hunter, C. J. and Strachan, N. J.: Consumer acceptability of interventions to reduce *Campylobacter* in the poultry food chain. *Food Control*, **35**, 260–266 (2014).
  - 14) 百瀬愛佳, 五十君静信: カンピロバクター「平成25年度食品の食中毒菌汚染実態調査における検査法(NIH-SJ-02)」。食品衛生検査指針微生物編. p. 312–315. 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京(2015).
  - 15) 内閣府食品安全委員会: 微生物・ウイルス評価書「鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ」。(2009). <https://www.fsc.go.jp/fsciiis/evaluationDocument/show/kya20041216001>
  - 16) 農林水産省生産局畜産部食肉鶏卵課: 食肉鶏卵速報. 平成27年3月(2015). [http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/pdf/monthly\\_h27m3.pdf](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/pdf/monthly_h27m3.pdf)
  - 17) 小野一晃, 辻りえ, 安藤陽子, 大塚佳代子, 柴田 穰ら: 国産および輸入鶏肉におけるカンピロバクターの汚染状況. *日獣会誌*, **56**, 103–105 (2003).
  - 18) Richard, V. P., Lefébure, T., Pavinski Bitar, P. D. and Stanhope, M. J.: Comparative characterization of the virulence gene clusters (lipooligosaccharide [LOS] and capsular polysaccharide [CPS]) for *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and related *Campylobacter* species. *Infect. Genet. Evol.*, **14**, 200–213 (2013).
  - 19) Rosenquist, H., Sommer, H. M., Nielsen, N. L. and Christensen, B. B.: The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int. J. Food Microbiol.*, **108**, 226–232 (2006).
  - 20) Sandberg, M., Hofshagen, M., Østensvik, Ø., Skjerve, E. and Innocent, G.: Survival of *Campylobacter* on frozen broiler carcasses as a function of time. *J. Food Prot.*, **68**, 1600–1605 (2005).
  - 21) Sheppard, S. K., Dallas, J. F., Strachan, N. J., MacRae, M., McCarthy, N. D., *et al.*: *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clin. Infect. Dis.*, **48**, 1072–1078 (2009).
  - 22) Stern, N.J., Hiatt, K.L., Alfredsson, G.A., Kristinsson, K.G., Reiersen, J., *et al.*: *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiol. Infect.*, **130**, 23–32 (2003).
  - 23) Wingstrand, A., Neimann, J., Engberg, J., Nielsen, E. M., Gerner-Smidt, P., *et al.*: Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 280–285 (2006).