

栃木県内流通食肉等の食中毒菌等汚染実態調査及び 緩慢解凍によるカンピロバクターの低減効果について

微生物部

鈴木 尚子 渡邊 裕子 桐谷 礼子 鈴木 兼一 船渡川 圭次

要旨

食肉等を原因とする食中毒は、牛・豚レバー及び豚肉の生食用の販売・提供が禁止された後も全国的に多発している状況がある。そこで、栃木県では食品事業者等への啓発に資するため、平成25年度から3年間、県内に流通する食肉等の食中毒菌等汚染実態調査を実施した。その結果、食肉等は通年で糞便系の汚染がみられ、特に国産鶏肉はサルモネラ及びカンピロバクターが約半数から検出された。また、カンピロバクターが検出された国産鶏肉の66%がMPN値100以上となり、食中毒を発生させるのに十分な菌量を保持していた。次に、緩慢解凍によるカンピロバクターの低減効果について検証を行ったところ、14日間の冷凍後緩慢解凍を行うと、カンピロバクター生残率は5%以下となった。これにより、緩慢解凍はカンピロバクター食中毒のリスクを低減する一手法になると考えられた。

キーワード：食肉等、汚染実態調査、MPN値、カンピロバクター、緩慢解凍

1 はじめに

食肉の生食のリスクを低減するため、平成23年10月1日から生食用食肉（牛肉であって内臓肉を除く）の規格基準が施行され、平成24年7月から牛レバー、平成27年6月から豚肉及び豚レバーの生食用の販売・提供が禁止された。しかし、全国的には、食肉等の生食や加熱不十分の食肉等の提供が原因とみられる食中毒が多発している。そこで、栃木県では食品事業者に対する食肉の適切な取扱いの指導及び県民の食中毒防止の啓発に資するため、平成25年度から3年間、県内に流通する食肉等の食中毒菌等汚染実態調査を実施した。

平成25年度の調査において、サルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌が多く検出されたため、平成26、27年度はMPN (Most Probable Number) 法を用いて定量を行い、食中毒のリスクを検討した。また、カンピロバクター属菌は食中毒を発生させる菌量が検出されたため、冷凍及び緩慢解凍による低減効果を検証した。

2 材料と方法

2.1 材料

平成25年度から平成27年度において、7月から8月（以下、夏季）及び11月から12月（以下、冬季）に県内小売店で購入した市販流通食肉327検体（鶏肉：ササミ46検体、ムネ51検体、モモ80検体、豚肉：レバー60検体、豚肉90検体）を供試検体とし、各試験において25gずつ採取した。

2.2 食中毒菌等検査

「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【厚労省】」に準拠し、糞便系大腸菌群、大腸菌、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌の検出を行った。また、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌のリアルタイム

PCR法にはQuickPrimer (Real Time) シリーズ（タカラバイオ）を使用した。なお、平成26、27年度はサルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌の検査はリアルタイムPCR法で陽性となった検体のみ培養法を行うこととし、また、サルモネラ属菌の選択増菌培地はラバポート・バシリアディス培地のみを使用し、省力化を図った。

2.3 サルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌の定量 (MPN法)

各段階3本ずつ3段階希釈における陽性検体100g当たりのMPN値を求めた。陽性の判定はリアルタイムPCR法で陽性となったものを陽性管数とした。

2.4 急速解凍、緩慢解凍によるカンピロバクターの低減効果

2.4.1 血液寒天培地を用いた生菌数測定

食中毒由来株 *C. jejuni* 14-01 を滅菌した市販鶏挽肉10gに 2.0×10^2 、 2.0×10^3 、 2.0×10^4 CFU/gとなるよう添加した後、速やかに -20°C の冷凍庫内で冷凍保存した。1, 3, 7, 及び14日間冷凍保存後、それぞれ 42°C で急速解凍及び 4°C 、5時間で緩慢解凍し、0.1%ペプトン加生食90mlを加えて10倍乳剤を作成、同液または10倍遠心濃縮液 $100 \mu\text{l}$ を血液寒天培地2枚に塗抹し、 42°C 48時間微好気培養を行い、発育集落数を計測した。

2.4.2 EMA-PCR法による生菌数測定

冷凍等によりVNC (Viable but Non-Culturable、生きているが培養できない)の状態となったカンピロバクターが存在するかどうかを確認するため、EMA-PCR法による生菌数測定を実施した。上記10倍乳剤2mlを遠心濃縮して $100 \mu\text{l}$ の菌体懸濁液を作成し、Viable Campylobacter Selection Kit for PCR (タカラバイオ)でEMA標識処理をした検体と無処理検体をQIAamp DNA Mini Kit (キアゲン)でDNA抽出し、リアルタイムPCR法で定量を試みた。各検体における(EMA標識処理定量

値/無処理定量値)より生存率を求め、菌添加時の生菌数を生存率100%と仮定し、各検体の生菌数を算出した。

3 結果

3.1 食肉等汚染実態調査における食中毒菌等検出状況

季節別の各食中毒菌等の汚染状況について表1に示す。

3年間の調査を通して腸管出血性大腸菌は検出されなかった。

糞便系大腸菌群及び大腸菌は、鶏肉及び豚レバーにおいて季節にかかわらず高い陽性率を示した。

サルモネラ属菌は、国産鶏肉において夏季 35 検体 (50.0%)、冬季 32 検体 (46.4%)、輸入鶏肉において夏季 4 検体 (21.1%)、冬季 3 検体 (15.8%)、国産豚肉レバーにおいて夏季 5 検体 (16.7%)、冬季 3 検体 (10.0%)、国産豚肉において夏季 1 検体 (4.0%) から検出された。

C. jejuni は、国産鶏肉において夏季 41 検体 (58.6%)、冬季 27 検体 (39.1%)、輸入鶏肉において夏季 1 検体 (5.3%)、冬季 5 検体 (26.3%)、国産豚レバーにおいて夏季 1 検体 (3.3%) から検出された。

C. coli は、国産鶏肉において夏季 3 検体 (4.3%)、冬季 2 検体 (2.9%)、輸入鶏肉において夏季、冬季 1 検体ずつ (5.3%)、国産豚レバーにおいて夏季、冬季 1 検体ずつ (3.3%)、国産豚肉において夏季 1 検体 (4.0%) から検出された。

輸入豚肉からは、サルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌は検出されなかった。

食中毒菌汚染が高率な国産鶏肉を検体ごとに見てみると、国産鶏肉 139 検体中カンピロバクター属菌のみが検出された検体は 32 検体 (23.0%)、サルモネラ属菌のみが検出された検体は 27 検体 (19.4%)、カンピロバクター属菌及びサルモネラ属菌が検出された検体は 39 検体 (28.1%) となり、98 検体、約 7 割の検体が食中毒菌に汚染されていることがわかった。(図1)

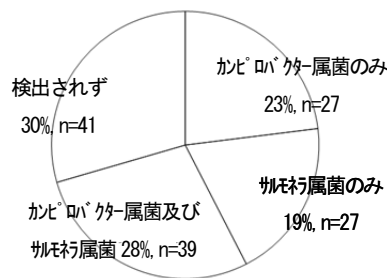


図1 国産鶏肉(n=139)食中毒菌検出状況

3.2 サルモネラ属菌の血清型別及び平成26、27年度陽性検体100g当たりのMPN値

分離されたサルモネラの血清型別を表2、陽性検体100g当たりのMPN値を表3に示す。国産鶏肉では *S. Infantis* が 53 検体 (79.1%) と最も多く、次いで *S. Manhattan*、*S. Typhimurium*、*S. Schwarzengrund* が検出され、*S. Infantis*、*S. Manhattan* 及び *S. Schwarzengrund* は3年続けて検出された。

陽性検体のMPN値は、国産鶏肉では30未満の検体が27検体 (65.8%)、100未満の検体は36検体 (87.8%) となった。また、輸入鶏肉では、30未満の検体が4検体 (80.0%)、430の検体が1検体 (20.0%) となった。

3.3 カンピロバクター属菌陽性検体100g当たりのMPN値

カンピロバクター属菌陽性検体100g当たりのMPN値を表4に示す。国産鶏肉のMPN値は30未満から11,000以上と幅が広く、100未満は16検体 (34.0%)、100以上は31検体 (66.0%) となった。輸入鶏肉では、30未満の検体が3検体 (60.0%)、36の検体が2検体 (40.0%) となった。

表1 食肉汚染実態調査 食中毒菌等検出状況

H25~27	検体数		糞便系大腸菌群				大腸菌				サルモネラ属菌				<i>C.jejuni</i>		<i>C.coli</i>	
	夏季	冬季	夏季		冬季		夏季		冬季		夏季		冬季		夏季	冬季	夏季	冬季
			陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)				
鶏肉	ササミ	24	22	24 (100)	22 (100)	21 (88)	17 (77)	10 (42)	8 (36)	10 (42)	6 (27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ムネ	25	26	24 (96)	26 (100)	19 (76)	20 (77)	13 (52)	13 (50)	14 (56)	12 (46)	1 (4.0)	1 (3.8)	1 (4.0)	1 (3.8)	1 (4.0)	1 (3.8)	1 (3.8)
	モモ	21	21	21 (100)	20 (95)	20 (95)	19 (90)	12 (57)	11 (52)	16 (76)	9 (43)	2 (10)	1 (4.8)	2 (10)	1 (4.8)	2 (10)	1 (4.8)	1 (4.8)
	計	70	69	69 (99)	68 (99)	64 (91)	56 (81)	35 (50)	32 (46)	41 (59)	27 (39)	3 (4.3)	2 (2.9)	3 (4.3)	2 (2.9)	3 (4.3)	2 (2.9)	2 (2.9)
豚肉	輸入 モモ	19	19	18 (95)	18 (95)	16 (84)	16 (84)	4 (21)	3 (16)	1 (5.3)	5 (26)	1 (5.3)	1 (5.3)	1 (5.3)	1 (5.3)	1 (5.3)	1 (5.3)	1 (5.3)
	レバー	30	30	28 (93)	25 (83)	27 (90)	25 (83)	5 (17)	3 (10)	1 (3.3)	0 (0)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)
	豚肉	25	25	19 (76)	15 (60)	16 (64)	12 (48)	1 (4.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.0)	0 (0)	1 (4.0)	0 (0)	0 (0)
	輸入 豚肉	20	20	14 (70)	7 (35)	13 (65)	7 (35)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	164	163	148	133	136	116	45	38	43	32	6	4	6	4	6	4	4	

表2 サルモネラ属菌陽性検体の血清型

	H25	陽性数	H26	陽性数	H27	陽性数	計	(%)
鶏肉 (国産) 陽性検体 n=67	Infantis	24	Infantis	17	Infantis	12	53	(79.1)
	Manhattan	1	Manhattan	3	Manhattan	1	5	(7.5)
					Typhimurium	4	4	(6.0)
	Schwarzengrund	1	Schwarzengrund	1	Schwarzengrund	1	3	(4.5)
			Thompson	1		1	1	(1.5)
鶏肉 (輸入) 陽性検体 n=7	Heidelberg	2	Heidelberg	1	Heidelberg	2	5	(71.4)
			Gloucester	1		1	1	(14.3)
			Infantis	1		1	1	(14.3)
			Typhimurium	2	Typhimurium	1	3	(37.5)
	豚レバー (国産) 陽性検体 n=8	Derby	1	Derby	1		2	(25.0)
豚肉 (国産) 陽性検体 n=1	Colindale	1				1	1	(12.5)
			型別不能	1	型別不能	1	2	(25.0)
	Infantis	1				1	1	(100)

表3 サルモネラ属菌陽性検体のMPN値

H26~27	検体数	陽性数	陽性率 (%)	サルモネラ属菌MPN値(/100g)										
				<30	36	74	92	140	150	230	430			
ササミ	夏季	15	5 (33)	3	1		1							
	冬季	13	3 (23)	1									2	
国産 ムネ 鶏肉	夏季	15	9 (60)	7		1	1							
	冬季	16	7 (44)	5	1									1
モモ 鶏肉	夏季	16	9 (56)	7	1				1					
	冬季	15	8 (53)	4	3								1	
計	90	41 (46)	27	6	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2
輸入鶏肉 モモ	夏季	14	2 (14)	2										
	冬季	14	3 (21)	2										1
国産豚肉 レバー	夏季	20	3 (15)	2	1									
	冬季	20	3 (15)	3										

表4 カンピロバクター属陽性検体のMPN値

H26~27	検体数	陽性数	陽性率 (%)	カンピロバクター属菌MPN値(/100g)																						
				<30	30	36	74	92	110	150	210	230	270	380	430	530	750	930	1,500	2,400	4,600	11,000	>11,000			
ササミ	夏季	15	4 (27)	3		1																				
	冬季	13	2 (15)																						1	
国産 ムネ 鶏肉	夏季	15	9 (60)	1	3	1					2	2														
	冬季	16	9 (56)	3	1						1	1						1	1	1						
モモ 鶏肉	夏季	16	14 (88)		1					1	2		3	1	2	1				1	1	1				
	冬季	15	9 (60)	1	1				1		2					1							2	1		
計	90	47 (52)	8	1	6	1	1	1	1	8	1	2	3	1	3	1	1	1	1	1	2	4	2			
輸入鶏肉モモ	冬季	14	5 (36)	3	2																					
国産豚レバー	夏季	20	2 (10)	1		1																				
国産豚肉	夏季	15	1 (6.7)																						1	

3.4 急速解凍及び緩慢解凍によるカンピロバクターの低減効果検体 100g 当たりのMPN値

血液寒天培地を用いた生菌数測定を行い、急速解凍及び緩慢解凍によるカンピロバクターの低減効果を調べた結果を図2、図3に示す。いずれの接種菌数及び冷凍保存日数においても、急速解凍に比べ緩慢解凍のほうが生残菌数は少なく、いずれの接種菌数においても、14日間

冷凍保存し緩慢解凍を行った場合は、生残率は5%未満となった。また、EMA-PCR法を用いた生菌数測定を行い、緩慢解凍によるカンピロバクターの低減効果を調べた結果を図4に示す。EMA-PCR法を用いた生菌数測定は、血液寒天培地を用いた培養法の生菌数測定に比べ生残菌数が少ない傾向となった。

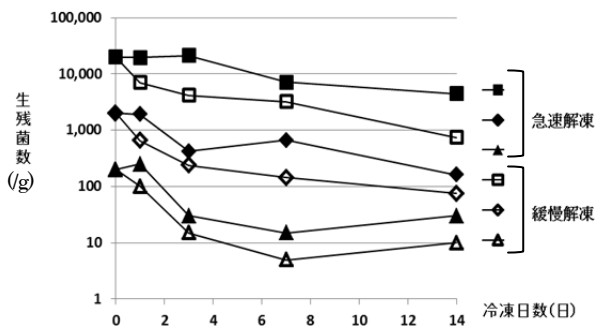


図2 急速・緩慢解凍によるカンピロバクターの生残菌数(/g)

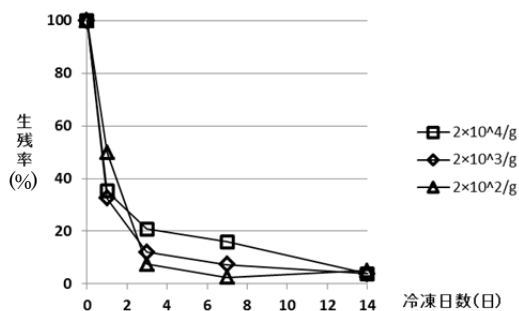


図3 緩慢解凍によるカンピロバクターの生残率(%)

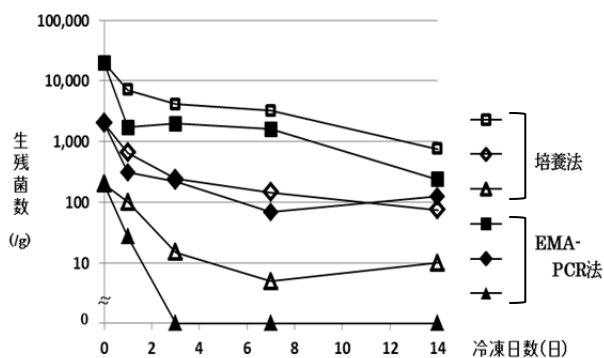


図4 緩慢解凍によるカンピロバクターの生残菌数(/g) (培養法とEMA-PCR法での生残菌数の比較)

4 考察

3年間の調査結果から、本県で市販されている食肉の多くから糞便系大腸菌群が検出された。また、国産鶏肉からは、カンピロバクター属菌のみ検出が23.0%、サルモネラ属菌のみ検出が19.4%、カンピロバクター属菌及びサルモネラ属菌検出が28.1%と約7割から食中毒菌が検出された。これらのことより、市販食肉等は通年で食中毒の原因となりうること及び食肉等の衛生状態に改善がみられないことが示唆された。

サルモネラ属菌が国産鶏肉等から多く検出されたため、菌の定量を行った。国産鶏肉のMPN値は100未満が87.8%となり、比較的少ない菌量の汚染であることがわかった。また、輸入鶏肉のMPN値が430を示したことからサルモネラ属菌は冷凍保存による影響を受けにくいと考えられること及び養鶏場ブロイラーの糞便から高率で分離される*S. Infantis*⁹⁾が食肉からも多く検出されることより、鶏肉のサルモネラ属菌の汚染は食鳥処理段階での腸内容物の汚染がそのまま残存していると考えられた。

カンピロバクター属菌も菌の定量を行ったところ、国産鶏肉のMPN値は100以上が66.0%となった。*C. jejuni*の発症最少菌量はヒトの感染実験で100~1000cfuと報告されており²⁾、国産鶏肉は食中毒を発生させるのに十分な菌量が付着していることが示された。また、輸入鶏肉のMPN値が30未満、36と低値を示したことから、長期保存及び凍結・解凍時による菌の損傷により菌量が減少したことが推測された。国産鶏肉の部位ごとに見ると、陽性率はモモ、ムネ、ササミの順に高く、どの部位も冬季に比べ夏季が高いが、MPN値に傾向はみられなかった。これらについては、国内ブロイラー鶏群のカンピロバクター保有率に季節性があること³⁾及び食鳥処理工程における腸内容物の易汚染部位や汚染程度の差に起因すると考えられた。

冷凍及び解凍によるカンピロバクターの低減効果では、

急速解凍よりも緩慢解凍のほうがより殺菌的に働くことが示唆された。これは、-5℃から0℃の最大氷結晶生成帯での時間が長くなること(緩慢解凍)により、細胞質膨張による細胞膜障害がより大きくなったためと思慮される。カンピロバクターは遺伝的多様性に富むことが知られており、菌株間で冷凍抵抗性に差異を示すことが明らかとなっているが⁴⁾、汚染菌量が少量であれば、凍結及び緩慢解凍することによって、食中毒を発生させるリスクを低減できると考えられた。

今回、冷凍等によりVNCの状態になったカンピロバクターが存在し食中毒に関与しているのではないかとの仮説を立て、EMA-PCR法と血液寒天培地を用いた生菌数測定と比較を行った。結果はEMA-PCR法の生残菌数のほうが少ない傾向となり、これらの実験系ではVNCの状態にあるカンピロバクターの存在を検証することはできなかった。これは、冷凍により細胞膜を損傷した生菌にEMAが浸透しDNAを修飾したためと考えられた。

カンピロバクターによる食中毒は平成26年には全国で306事例発生しており、ノロウイルスの293事例を抑え病因物質の1位になっている⁵⁾。原因食品としては鶏肉が特に多い。平成21年6月には食品安全委員会は鶏肉中のカンピロバクターのリスク評価を報告し、農場での鶏のカンピロバクター汚染率の低減及び食鳥処理場での汚染農場と非汚染農場の鶏の区分処理等を提言しているが、これらの交差汚染防止対策は実効性に乏しい。現状では家庭または飲食店での食中毒対策が重要であり、生食の割合や調理時交差汚染を現状より80%低減することができれば、食中毒のリスクがそれぞれ69.6%及び9.4%低減されると推定されている⁶⁾。

これまでの調査で、県内流通国産鶏肉がサルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌に高率に汚染され、カンピロバクター属菌においては食中毒を発生させるのに十分な菌量が付着していることが明らかになった。これら食肉の食中毒菌汚染状況を踏まえ、生や加熱不十分の食肉を喫食する危険性や交差汚染を起こさない食品の取り扱いについて、県内食品事業者や県民に広く知らしめることは、食肉等を原因とする食中毒防止に非常に有効であると考えられる。また、食肉の冷凍及び緩慢解凍はカンピロバクター属菌の生菌数を減らせることから、食中毒のリスクを低減する手法の一つになり得ると考えられる。

5 参考文献

- 1) 食品健康影響評価のためのリスクプロファイル～鶏肉におけるサルモネラ属菌～(改訂版)、食品安全委員会、2012年1月
- 2) 品川邦汎、カンピロバクター食中毒とその予防対策、(財)食品分析開発センター、2011年2月

- 3) 食品安全に関するリスクプロファイルシート（細菌）、農林水産省、2015年2月16日
- 4) 朝倉宏、山本詩織、橋理人、吉村昌徳、山本茂貴、五十君静信、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、日本食品微生物学会雑誌、32(2)、159-166、2015
- 5) 食中毒発生事例、厚生労働省
- 6) 鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ、食品安全委員会、2009年6月25日