

市販食肉等からのカンピロバクター検出と低温保存での菌消長

Detection of *Campylobacter* in Meats and Survival of *Campylobacter* at Low Temperature

渡邊 節 川野 みち 小林 妙子
山田 わか 齋藤 紀行 川向 和雄*

Setsu WATANABE, Michi KAWANO, Taeko KOBAYASHI
Waka YAMADA, Noriyuki SAITO, Kazuo KAWAMUKAI

2004年6月から2005年1月まで、県内市販食肉42検体、と畜場の牛胆汁30検体、計72検体についてカンピロバクターの検出を試みたところ、23検体(31.9%)から菌を検出した。また、簡易定性検査法として実施した食肉包装パック内の浸出液32検体中9検体(28.1%)から菌を検出した。検体中のカンピロバクター菌数は食肉等では800cfu/g以下であったが、牛胆汁は $10^3 \sim 10^6$ cfu/gと高い汚染であった。分離された菌株の血清型別は主にBおよびD群が多く検出され、また薬剤感受性試験は26菌株のうち3菌株がニューキノロン系薬剤に耐性を示した。豚レバーを用いたカンピロバクターの保存温度別の菌消長実験の結果、4℃、-20℃いずれの温度でも減少率が小さいことが確認された。

キーワード：カンピロバクター；市販食肉；牛胆汁；浸出液；消長

Keywords : *Campylobacter* sp. ; commercial meat ; bovine bile ; weep ; survival of *Campylobacter*

1 はじめに

近年、わが国におけるカンピロバクター食中毒は増加傾向にあり、2003年の食中毒事件数は491件と第2位のサルモネラ350件を大きく上回っている¹⁾。カンピロバクターは家畜や家禽の腸管内に広く分布していることから、と畜場や食鳥処理場の解体工程で食肉を汚染することがあり、これが食中毒発生の要因になると指摘されている。1982年、本県で鶏肉を原因とする集団食中毒が報告されて以来²⁾、国内で鶏肉を原因とする食中毒が数多く報告されてきた。一方、原因食品となる多くの食肉、特に鶏肉では高率に汚染されていることが報告されている^{3)~6)}。2003年、本県において、牛レバーが原因食品と推定された本菌による食中毒事例が数件発生したことから⁷⁾、カンピロバクター食中毒予防のために、県内で流通する牛レバーを含めた市販食肉汚染実態を把握することが重要と考えられた。そこでカンピロバクターの汚染状況を市販食肉と牛レバーの汚染源と推定されている⁸⁾牛胆汁について実施した。カンピロバクターの検出は、通常検査対象をホモジナイズした直接分離法あるいは増菌分離法が用いられる。我々は、簡易定性検査法として食肉包装パック内に浸出した液(浸出液)を利用して菌の検出が可能であるかについても検討した。一方、カンピロバクター食中毒ではその発症菌量が少ないことが指摘されている⁹⁾。このことから、流通過程で食肉中の

菌の増減を把握することが重要であると思われた。そこで、食肉等の低温保存における菌の生残性を、4℃および-20℃で消長実験として行ったので報告する。

2 材 料

2.1 供試検体

2004年6月から2005年1月に、県内で購入した市販食肉22検体(内訳：鶏肉11検体、豚肉6検体、牛肉5検体)、内臓20検体(内訳：鶏レバー11検体、豚レバー5検体、牛レバー4検体)、食肉包装パック内に浸み出した液(浸出液)32検体(内訳：鶏肉由来22検体、鶏レバー由来10検体)およびと畜場から分与された牛胆汁30検体、計104検体を供試検体とした。

2.2 培地

カンピロバクターの菌分離にはCCDA培地(OXOID)を、増菌用としてプレストンカンピロバクター選択増菌培地(OXOID:Preston)およびボルトン選択増菌培地(OXOID:Bolton)を用いた。

2.3 消長試験用菌

本実験には鶏肉由来の*Campylobacter jejuni*(*C. jejuni*) Cp40株を用いた。

3 方 法

3.1 試料の調整

食肉やレバーは25gを秤量し、Preston培地100mlを加

* 現 食と暮らしの安全推進課

え約1分間ホモジナイズした5倍乳剤を試料とした。簡易定性検査法として、食肉包装パック内の浸出液あるいはパック内の浸出液の浸み込んだ敷紙を検査対象とし、これらをbolton培地に添加・浸漬して培養した。牛胆汁は25mlを無菌的に採取しPreston培地225mlを加え、10倍希釈液としこれを試料とした。

3.2 カンピロバクターの分離

鶏肉等からのカンピロバクター検出は、CCDA培地を用い直接平板塗抹法による定量法で行った。すなわち、各検体は10倍階段希釈により調整し、これをCCDA 2枚に0.1ml滴下しコンラージ棒で塗抹した。42-48時間微好気(N₂:85%, CO₂:10%, O₂:5%)培養後、平板培地上の集落を常法⁹⁾およびPCR法¹⁰⁾を用いた特異遺伝子の確認により*C. jejuni*、*C. coli*を同定し、集落数を求め、2枚の平均値から1g当たりの菌数(cfu/g)を算定した。

3.3 血清型別

分離した*C. jejuni*は市販のカンピロバクター免疫血清(デンカ生研)を用いてPennerの血清型別試験を行った。

3.4 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、ドライプレート(栄研化学)を用い微量液体希釈法で実施した。それぞれの被検菌をミューラーヒントン培地に37-48時間微好気培養後、希釈しマクファランド1に調整し17薬剤ABPC(アンピシリン), PIPC(ピペラシリン), CEZ(セファゾリン), CTM(セフォチアム), CCL(セファクロル), FMOX(フロモキシセフ), CPDX(セフポドキシム), AZT(アズトレオナム), IPM(イミペネム), MEPM(メロペネム), GM(ゲンタマイシン), AMK(アミカシン), MINO(ミノサイクリン), FOM(ホスホマイシン), LVFX・ST(レボフロキサシン・スルファメトキサゾールトリメトプリム)に対する感受性試験を実施した。

3.5 カンピロバクターの低温保存での消長実験

*C. jejuni*Cp40株をPreston培地で24時間微好気培養し、これをPBSで希釈し、最終濃度が10²/g・ml(実験Aとする)と10³/g・ml(実験Bとする)の2濃度に調整した。それぞれの菌液をPBSおよびカンピロバクター陰性の豚レバー乳剤に添加し、これを50ml容量のファルコンチューブ各6本に分注し4-および-20の各温度に保存した。保存後1日、3日、5日、7日および14日目に菌数を測定した。すなわち上述の5倍乳剤を空の試験管3本に分注し、さらに乳剤の1ml、0.1ml、必要に応じて0.01mlを10mlのPreston培地3本ずつに接種したMPN3本法を行った。各濃度のMPN管は42-24時間微好気培養した後、各管から1白金耳をCCDA培地に塗抹し、42-48時間微好気培養した。培地上の集落を常法およびPCR法でカンピロバクターと同定し、試験管のカンピロバクター陽性本数を最確数表にあてはめ、MPN値を求めた。

4 結 果

4.1 食肉の検出状況

表1に食肉等からのカンピロバクターの検出状況を示した。調査した食肉のうち鶏肉11検体中6検体(54.5%)、鶏レバー11検体中10検体(91.0%)、牛レバー4検体中1検体(25.0%)から*C. jejuni*が検出されたが、豚肉、牛肉、豚レバーからは菌が検出されなかった。なお、結果は示していないが、ムネ、モモ、ササミ等の鶏肉の部位別検出率に差はなかった。牛胆汁30検体中6検体(20.0%)から*C. jejuni*が検出され、1検体(3.3%)からは同時に*C. coli*が検出された。

4.2 食肉のカンピロバクター菌数

直接塗抹法によるカンピロバクターの定量検査の結果を示した(表2)。鶏肉では1検体から50cfu/gが検出されたが残りの5検体は50cfu/g未満であった。鶏レバーでは50cfu/gが1検体、10²オーダーが7検体検出された。それ以外の2検体は50cfu/g未満であった。牛レバーも50cfu/g未満であったが、牛胆汁検体からの検出菌量は10³オーダーが1検体、10⁴オーダーが1検体、10⁵オーダーが3検体、10⁶オーダーが1検体であった。

4.3 鶏肉包装の浸出液からの検出

簡易定性検査法として、浸出液をbolton培地で増菌培養し、菌検出を行った。その結果、鶏肉22検体中6

表1 食肉等からのカンピロバクター検出状況

検体名	検体数	陽性検体数		検出率(%)
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	
鶏肉	11	6	0	54.5
豚肉	6	0	0	0
牛肉	5	0	0	0
鶏レバー	11	10	0	91.0
豚レバー	5	0	0	0
牛レバー	4	1	0	25
牛胆汁	30	6	1*	20
計	72	23	1	31.9

*同一検体から*C. jejuni*、*C. coli*を分離した。

表2 カンピロバクター生菌数(直接法)

検体名	陽性数	菌数(cfu/g・ml)						
		<50	50-100	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
鶏肉	6	5	1					
鶏レバー	10	2	1	7				
牛レバー	1	1						
牛胆汁	6				1	1	3	1
計	23	8	2	7	1	1	3	1

検体 (27.3%), 鶏レバー10検体中3検体 (30.0%), 計9検体 (28.1%) から *C. jejuni* が検出された (表3)。

4.4 血清型別

鶏肉由来14菌株, 鶏レバー由来35菌株, 牛レバー由来2菌株および牛胆汁由来18菌株合計69菌株を分離し, これらについてPenner型別法による血清型別試験を行った。その結果, B, D群が各10菌株 (各14.5%) と最も多く, Y群が4菌株 (5.8%), I, N, O群が各3菌株 (4.3%), Z6群が2菌株 (2.9%), A, C, L, R, Z4, Z5, D・S混合, L・S混合, R・Z混合群が各1菌株 (1.4%) ずつであったが, 25菌株は型別不能 (UT: 36.2%) であった (図1)。鶏肉や鶏レバー由来の49株はBとD群が計18菌株 (34.7%) であった。牛胆汁では18菌株中B群が2菌株 (11.1%), 型別不能が13菌株 (72.2%) であった。

4.5 薬剤感受性試験

分離菌26株について17種の薬剤に対する感受性試験を実施した結果, 鶏肉, 鶏レバー, 牛胆汁各1菌株計3菌株からニューキノロン系薬剤LVFXに耐性を示した。

4.6 カンピロバクターの低温保存における消長実験

実験A: 菌をPBSに添加して4に保存した場合では7日目まで徐々に減少し, 14日目では検出されなかった。-20保存では, 1日目から菌は検出されなかった。一方, 豚レバー乳剤における菌の消長は4保存で7日目まで $10 \sim 10^2$ オーダーの菌量が検出された。-20保存では1日目で 10 オーダーとなったが, 5日目まで菌量が維持された。14日目ではいずれの検体からも菌は検出されなかった (図2)。

実験B: PBSに菌を添加し, 4あるいは-20で

保存した場合の菌の減少は実験Aと同じ挙動を示した。一方, 豚レバー乳剤の4, -20保存とも7日目まで $10^2 \sim 10^3$ オーダーで実験Aと同じ減少傾向であったが, 14日目でも $10^2 \sim 10^3$ オーダーが検出された (図3)。

5 考察

近年, カンピロバクターによる食中毒が全国的に多発し食中毒発生件数の30%以上を占めている。カンピロバクター食中毒の原因食品は主に鶏肉とされているが, 牛レバーが原因の事例も多い。国内外の研究者によると鶏肉等からのカンピロバクター検出率は40%以上, 牛レバーからは10%以上であるとされている^{3)~6)}。今回実施した市販鶏肉におけるカンピロバクター汚染実態調査の結果, 菌検出率は鶏肉で54.5%, 鶏レバー91.0%, 牛レバー25.0%と, 本県においても市販食肉がカンピロバクターに汚染されていること, また, 肉よりもレバーの方が高率に汚染されていることが確認された。牛レバーの汚染は胆汁中の菌によると考えられることから, 牛胆汁について菌検出を行った結果, 30検体中6検体 (20.0%) から *C. jejuni* が検出された。1検体からは *C. coli* も同時に検出された。

直接塗抹法で算出した食肉中の菌量は, 鶏肉で1検体が50cfu/gで, 他の5検体は検出限界以下であった。鶏レバーは 10^2 /gオーダーのものが7検体で全体の70%を占め, 食肉より内臓の方が汚染が高い値を示した。川森ら¹¹⁾も, 市販食肉から検出される菌数はg当たり100以下であることを報告しており, 食肉の菌汚染程度は低いと思われた。しかし, 胆汁中の菌量は多く, 胆汁中のカンピロバクターは4保存で約2週間

表3 浸出液からのカンピロバクター検出

検体名	検体数	陽性検体数		検出率 (%)
		<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	
ムネ肉	7	2	0	28.6
モモ肉	11	2	0	18.2
手羽肉	10	3	0	30.0
レバー	4	2	0	50.0
計	32	9	0	28.1

分離株数

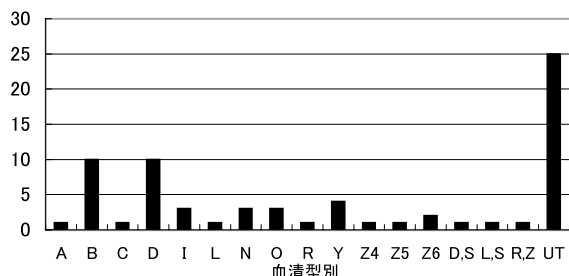


図1 *C.jejuni* 分離株の血清型別 (Penner)

MPN値/g

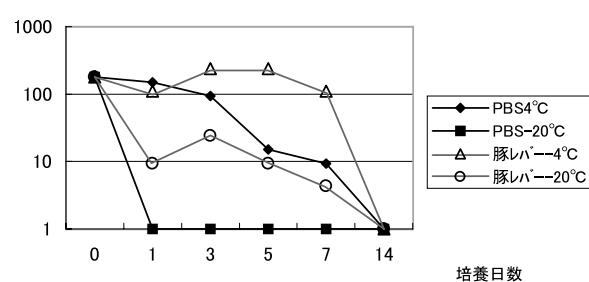


図2 保存温度別消長試験 (A)

MPN値/g

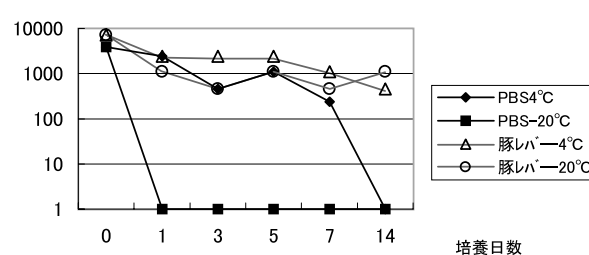


図3 保存温度別消長試験 (B)

ほとんど菌量変化がないとの報告もあり⁸⁾、胆汁がカンピロバクターの汚染源となる可能性が強く示唆され、と畜場での汚染拡大防止が重要であると思われた。

次に鶏肉からの簡易定性検査法として、食肉包装パック内の浸出液あるいは浸出液が浸み込んだ敷紙からの菌検出を試み、32検体中9検体(28.1%)から菌を検出した。今回、市販鶏肉の少量パックを検査対象として得られた結果であることから、本検査法は試料が少ない、もしくは浸出液のみの検体からの菌検出法として有効であると思われた。

カンピロバクターの血清型別は、Penner型およびLior型で分類されるが、Lior型別用抗血清は市販されておらず、本研究には市販のPenner型別試験用試薬で分類した。鶏肉等から分離された69菌株は、44菌株が16種類の型に分けられたが、25菌株はPenner型では分類できなかった。血清型はB群、D群が最も多く、ともに10菌株(14.5%)であった。血清型の違いによる病原性の強さは明らかではないが、B、D群は食中毒事例から高頻度に検出される血清型である。胆汁から分離された菌株にはB、D群は少なくB群が2菌株のみで、型不明が72.2%を占めた。通常、細菌性食中毒の疫学調査では原因菌の血清型別は重要な指標となるが、同一検体から複数の血清型菌株が検出されたり血清型不明菌株が多数検出される場合のカンピロバクター食中毒事例においては原因の特定は困難であると思われた。さらに、今回のように牛胆汁の1検体から*C. jejuni*と*C. coli*の2種類のカンピロバクターが検出される例もあり、カンピロバクター食中毒事例での菌検出と血清型別による原因究明は慎重にする必要があると感じた。

カンピロバクターの治療の第一選択剤としてはエリスロマイシンやニューキノロン系薬剤が推奨されている¹²⁾。しかし近年ニューキノロン系薬剤に対する耐性菌の増加が問題となってきており、今回調査した検体26菌株のうち3菌株(11.5%)がLVFXに耐性を示した。しかも、検出した2菌株は市販鶏肉由来であったことから、今後とも食肉からのカンピロバクター汚染状況の把握と分離菌のキノロン系薬剤耐性について継続した調査が重要と思われる。

カンピロバクターは少量菌量で感染が成立するとされている⁸⁾。カンピロバクターで汚染された食肉は消

費までの流過程でいかに菌が消滅していくかを、食肉に菌を添加して低温保存し実験的に調べた。その結果、PBSに菌を添加した場合は、-20℃では1日目で、4℃では14日目で菌が検出されなかった。一方、豚レバー乳剤に菌を添加した場合は4℃および-20℃でも7日目までほとんど菌の減少は認められなかった。つまり、食肉中の菌は低温に管理されていても流過程や施設での保管中完全に死滅することなく生残し、食中毒の感染源となる可能性が示唆された。カンピロバクターによる食中毒防止のためには、食肉の十分な加熱調理とともに、調理器具や調理者の手指の消毒を行い二次汚染防止を徹底することが必要であると思われる。

- 1) 食品衛生研究, 9, 62 (2004)
- 2) 齋藤紀行, 白取剛彦, 山本仁: 医学のあゆみ, 136 (7), 525 (1986)
- 3) 神保勝彦, 小久保彌太郎, 金子誠二, 桐谷礼子, 松本昌雄: 東京衛研年報, 37, 129 (1986)
- 4) 大畑克彦, 山崎史恵, 佐原啓二, 大村正美, 増田高志, 堀渉, 内藤満, 赤羽荘資, 花村悦男, 山口人志, 森田剛史, 木村隆彦, 山口俊英, 興津馨, 勝又國久, 久嶋弘, 幾島隆雄, 長谷川進明, 早川敦子, 大成幸男, 服部道明, 岡村芳静, 宮下弘: 静岡県衛生環境センター報告, 36, 1 (1993)
- 5) 小野一晃, 辻りえ, 安藤陽子, 大塚佳代子, 柴田穰, 齋藤章暢, 増谷寿彦: 日獣会誌, 56, 103 (2003)
- 6) 小野一晃, 齋藤志保子, 川森文彦, 後藤公吉, 重茂克彦, 品川邦汎: 日獣会誌, 57, 595 (2004)
- 7) 宮城県保健環境センター年報, 22, 177 (2004)
- 8) 坊菌慶信, 原智之, 小林由紀, 沓木力晴: 日本食品微生物学会学術総会抄録, p106 (2003)
- 9) 坂崎利一: “食水系感染症と細菌性食中毒”, p336 (2000)(中央法規)
- 10) CHRISTIAN FERMER, EVA OLSSON ENGVALL: *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 37, 3370 (1999)
- 11) 川森文彦, 有田世乃, 西尾智裕, 三輪憲永, 増田高志, 秋山真人: 静岡県環境衛生科学研究所報告, 45, 5 (2002)
- 12) 三澤尚明: 日本食品微生物学会雑誌, 20(3), 91 (2003)