=原 著=

食鳥処理場におけるカンピロバクター交差汚染状況

藤田 雅 弘^{*1,†}・遠藤健太郎^{*2}・塩 野 雅 孝^{*1}・
森田 幸 雄^{*3}・朝 倉 宏^{*4}・山 本 茂 貴^{*5}

(^{*1}群馬県衛生環境研究所, ^{*2}群馬県食肉衛生検査所, ^{*3}東京家政大学, ^{*4}国立医薬品食品衛生研究所, ^{*5}東海大学)

(受付: 平成28年5月19日)

(受理: 平成28年8月12日)

Campylobacter Prevalence in Broiler Flocks and Cross-Contamination of Carcasses at a Chicken Slaughterhouse

Masahiro FUJITA^{*1,†}, Kentaro ENDO^{*2}, Masataka SHIONO^{*1},
Yukio MORITA^{*3}, Hiroshi ASAKURA^{*4} and Shigeki YAMAMOTO^{*5}

(^{*1}Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, Kamioki, Maebashi, Gunma 371-0052;

Corresponding author

^{*2}Gunma Prefectural Meat Inspection Office, Tamamura, Sawa, Gunma 370-1103

^{*3}Tokyo Kasei University, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8602

^{*4}National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

^{*5}Tokai University, Shizuoka 424-8610)

In this study, we investigated *Campylobacter* prevalence in chicken fecal samples and cross-contamination of chicken carcass surface samples at a slaughterhouse, with an aim toward the production of *Campylobacter*-free chicken meat. Twenty-four broiler flocks comprising a total of 120 chickens were examined. *C. jejuni* were isolated in fecal samples from 34 chickens (28.3%) in 12 flocks, and *C. jejuni* and *C. coli* were from 5 chickens (4.2%) in a flock, respectively. A total of 13 *Campylobacter*-positive flocks and 11 *Campylobacter*-free flocks existed in this research. Immediately after all *Campylobacter*-free flocks had been slaughtered, no *Campylobacter* could be detected from the chicken carcass surfaces. However, all slaughtered flocks, including those that were initially *Campylobacter*-free, were later found to have been cross-contaminated by *Campylobacter*-positive flocks slaughtered on the same day. Our results indicate that preventing cross-contamination from *Campylobacter*-positive flocks is a crucial consideration for chicken slaughterhouse to produce *Campylobacter*-free chicken meat.

Key words: broiler flocks, *Campylobacter*, chicken carcass, chicken slaughterhouse, cross contamination

緒 言

2015年のわが国の食中毒のうちカンピロバクターによるものは発生件数の26.5% (318/1,202件)、患者数の

9.2% (2,089/22,718)である。この発生件数、患者数はともにノロウイルス食中毒に次いで第2位であり、本食中毒の発生を減少させることは食品衛生上重要な課題である。

カンピロバクターの本来の生息場所は家畜・家禽の腸管内であり、我が国の牛および鶏は主に *C. jejuni* を、豚は *C. coli* を保菌している^{1,8,10,11,13}。現在、牛や豚のと畜処理については、と畜場法関連法令の改正によって、と体に直接接触する機械や器具は1頭を処理するごとに83℃以上の温湯で洗浄・消毒することなどや、牛につい

†連絡先

^{*1} ☎ 371-0052 前橋市上沖町378

^{*2} ☎ 370-1103 群馬県佐波郡玉村町樋越305-7

^{*3} ☎ 173-8602 東京都板橋区加賀1-18-1

^{*4} ☎ 158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

^{*5} ☎ 424-8610 静岡市清水区折戸3-20-1

ては腸管からの腸内容の漏出による枝肉への汚染を防ぐ目的として、肛門および食道の結紮が行われているとともに、枝肉に腸内容が漏出した際には汚染箇所のトリミングが行われている。また、牛や豚のレバーや胆汁にはカンピロバクターに加え、腸管出血性大腸菌を保菌しているものもあることから^{3,6,12,15)}、現在は牛・豚レバーの生食は禁止されている。一方、鶏は食鳥処理場での連続処理による脱羽や内臓摘出・内外洗浄時等に腸内容物と体へ付着することなどによるカンピロバクター汚染が少なからず生じてしまう^{10,11,14)}。

今日、カンピロバクター食中毒の制御のため、鶏肉のカンピロバクター汚染を減少させることが食品衛生上急務である。

食鳥処理場搬入前の農場段階でカンピロバクター汚染鶏群と非汚染鶏群を調べ、食鳥処理場ではカンピロバクター汚染鶏群を先に処理し、次に非汚染鶏群を処理することを区分処理という。2009年に示された、食品安全委員会の「微生物・ウイルス評価書 鶏肉のカンピロバクター・ジェジュニ／コリ」(http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyo2-campylobacter_k_n.pdf) (以下「食品安全委員会評価書」)によると、区分処理を行うことで鶏肉のカンピロバクター汚染を低減する効果が示されている。

今回、区分処理の効果を確認するため、食鳥処理場に搬入される鶏群における盲腸便の検査結果から汚染鶏群・非汚染鶏群を定め、その処理と体の拭き取り調査により、汚染群からの交差汚染が生じるのか、その実態を調査した。また、盲腸内および体の拭き取りから分離したカンピロバクターはPolymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)を実施して遺伝子型を確定し、汚染の関連性について調査した。

材料および方法

調査日・調査回数・処理鶏群等

2012年5月に4回(5月10日, 14日, 24日, 31日), 7月に3回(7月10日, 17日, 26日)および10月に2回(10月16日, 30日)の計9回, I~XVIIの17の養鶏場から24群の鶏が処理された。I, III, VIII, X, XIII, XIV, XVの5養鶏場は2回, ほかの12養鶏場は1回処理された。

搬入鶏群の盲腸便および処理と体の拭き取り検査

検体は盲腸便および体の拭き取りを用いた。盲腸便は搬入鶏群ごとに5羽の盲腸便を内臓摘出時に採取した。採取した盲腸便1gは10倍量のPreston ブイヨン(Oxoid)に加えて、増菌培養を行った。と体の拭き取りは「食鳥処理場における HACCP 方式による衛生管理指針」(1992)⁴⁾に記載された方法で「脱羽後」, 「内臓摘出後」ならびに「チラー通過後」に行い、処理する鶏群が切り替わるごとに体胸部を拭き取った。拭き取り検体は同一群の3羽のと体胸部(5×5 cm)を各々滅菌ガーゼ

Table 1. Isolation of *Campylobacter* spp. from samples and flocks

Species	Cecal feces: 120 samples, 24 flocks	
	No. of positive samples (%)	No. of positive flocks (%)
<i>C. jejuni</i> only	34 (28.3)	12 ¹⁾ (50.0)
<i>C. jejuni</i> and <i>C. coli</i>	5 (4.2)	1 ²⁾ (4.2)
Total	39 (32.5)	13 (54.2)

¹⁾ III-1, III-2, VIII-1, VIII-2, IX, X-1, X-2, XII, XIV-1, XIV-2, XV-1, XV-2.

²⁾ XIII-2.

タンポン(10×10 cm)にて拭き取り、3羽分まとめて30 mlのPBSに浮遊させた後、その拭き取り液10 mlを2倍濃度Preston ブイヨンに加えて、42℃, 24時間、微好気条件下で増菌培養を実施した。

盲腸便検体・拭き取り検体ともに培養したPreston ブイヨンの1白金耳をButzler 培地(Oxoid)およびmCCDA (Oxoid)に塗抹後、42℃, 48時間、微好気培養を行った。カンピロバクター類似集落(Butzler 培地, mCCDAともに露滴状光沢ある白色集落)はグラム染色を行いグラム陰性、S字状桿菌を確認後、カンピロバクター LA (デンカ生研)で凝集を確認したものをカンピロバクター属とした。さらにアピヘリコ(バイオメリュー)およびKlenaら⁴⁾のmultiplex-PCRを実施し、菌種の同定を行った。

PCR-RFLP法による分離菌株の遺伝子型別法

分離したカンピロバクターからのDNAの抽出は1 μl用のプラスチック製ディスクローザ白金耳で集落をかき取り、500 μlの滅菌超純水(ニッポンジーン)に浮遊させ、95℃で10分間加熱後、氷上で冷却した。それを14,000 gで10分間遠心分離し、上清をテンプレートとした。PCRは、GoTaq Master Mix (Promega)を使用し、Wassenaarらのプライマー¹⁶⁾を用いて*flagellin A*遺伝子を増幅した。増幅したPCR産物は2%アガロースS(和光純薬工業)で電気泳動後、単一なバンドを確認した。RFLPはNachamkinらの方法⁸⁾に準拠した。PCR産物20 μl当たり1単位の*DdeI* (Roche)および*HinfI* (Roche)で切断し、3% Nusieve GTGアガロースゲル(Lonza)で電気泳動し、切断されたDNAのバンドの出現パターンを観察・記録・比較した。

成 績

処理鶏のカンピロバクター保菌状況

処理された鶏の盲腸便120検体中34検体(28.3%)から*C. jejuni*のみが、5検体(4.2%)から*C. jejuni*と*C. coli*の両菌種が検出された。処理鶏群ごとにみると24群中12群(50.0%)から*C. jejuni*のみが、1群(4.2%)からは*C. jejuni*と*C. coli*が検出された(Table 1)。盲腸便からカンピロバクターが分離された群を汚染鶏群とすると、13

Fig. 1. PCR-RFLP Pictures of restriction enzyme *DdeI* and *HinfI*

群, 8養鶏場(III-1, III-2, VIII-1, VIII-2, IX, X-1, X-2, XII, XIII-2, XIV-1, XIV-2, XV-1, XV-2)が該当した。そのうち *C. jejuni* と *C. coli* の両菌種が分離された養鶏場はXIII-2で, その他の養鶏場は *C. jejuni* のみが分離された。一方, 盲腸便からカンピロバクターが分離できない群を非汚染鶏群とすると非汚染鶏群は11群, 10養鶏場(I-1, I-2, II, IV, V, VI, VII, XI, XIII-1, XVI, XVII)が該当した。養鶏場XIIIは7月26日に2群が処理されたがXIII-1は非汚染鶏群, XIII-2は汚染鶏群であった。

分離 *C. jejuni* のPCR-RFLP法による遺伝子型

盲腸便および体の拭き取り検体から分離された *C. jejuni* についてPCR-RFLPを行った。制限酵素 *DdeI* の切断パターンはD1~D10の10パターン, 制限酵素 *HinfI* の切断パターンはH1~H5の5パターンであった(Fig. 1)。この二つの制限酵素による切断パターンの組合せによってTable 2のとおりA~Nの14の遺伝子型に型別した。

搬入群ごとの盲腸便および拭き取り検体からの検出菌種または検出 *C. jejuni* 遺伝子型(Table 3)

盲腸便から14種, 脱羽後と体から11種, 内臓摘出後と体から10種, チラー通過後と体から4種の *C. jejuni* 遺伝子型が検出された。 *C. coli* は7月26日に処理した

Table 2. PCR-RFLP typing by using 2 kinds of restriction enzyme

	<i>DdeI</i> typing									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
<i>HinfI</i> typing										
H1	A	C	—	E	—	—	—	J	L	N
H2	—	—	D	—	—	—	—	—	—	—
H3	B	—	—	—	F	H	—	K	—	—
H4	—	—	—	—	G	—	—	—	M	—
H5	—	—	—	—	—	—	I	—	—	—

—: Not applicable.

XIII-2群の盲腸便と脱羽後と体・内臓摘出後と体から検出されたが, チラー通過後のと体からはカンピロバクターは分離できなかった。

非汚染鶏群のみを処理した5月14日, 5月24日においては, 脱羽後と体・内臓摘出後と体・チラー通過後と体からカンピロバクターは分離できなかった。

汚染鶏群のみを処理した5月31日, 10月16日の脱羽後と体・内臓摘出後と体からカンピロバクターが分離されたが, チラー通過後と体からはカンピロバクターは分離できなかった。

非汚染鶏群を先に処理した後に汚染鶏群を処理した5月10日, 7月26日および10月30日では, 非汚染鶏群の脱羽後と体・内臓摘出後と体・チラー通過後と体からカンピロバクターは分離できなかった。しかし, その後に処理した汚染鶏群の脱羽後と体・内臓摘出後と体・チラー通過後と体の多くからカンピロバクターが分離された。

汚染鶏群を先に処理した後に非汚染鶏群を処理した7月10日および7月17日では, 汚染鶏群だけでなく非汚染鶏群の脱羽後と体・内臓摘出後と体からカンピロバクターが分離された。

分離 *C. jejuni* の遺伝子型では, 13の汚染鶏群のうち6群が複数の遺伝子型を, 7群が一つの遺伝子型を保有していた。汚染鶏群では, 盲腸便から分離された遺伝子型のいずれかがと体拭き取り検体から分離された例が11群あった。汚染鶏群を先に処理した後, 非汚染鶏群を処理した7月10日では最後(3群目)に処理された非汚染鶏群(XI)のと体拭き取り検体から, 最初に処理した汚染鶏群(X-1)のA型と2番目に処理した汚染鶏群(III-2)のE型が分離された。同様に, 7月17日では2番目に処理した非汚染鶏群(I-2)のと体拭き取り検体から最初に処理した汚染群(X-2)のG型が分離された。

チラー通過後と体からカンピロバクターが分離された3群(7月10日処理のX-1, 7月17日処理のX-2, XII, 7月26日処理のXIII-2)はいずれも汚染鶏群であった。盲腸便に保有しているPCR-RFLP型と同じ遺伝子型が脱羽後と体または内臓摘出後と体から検出(13中11検体)されるとともに, チラー通過後と体からも検出(同3検体)された。

Table 3. Isolation of *Campylobacter* spp. and PCR-RELP type of *C. jejuni* from cecal faces and carcass surface samples.

Date	Flock	Cecal feces		Carcass surface					
		Isolation ¹⁾	Species or PCRRFLP type of <i>C. jejuni</i>	After defeathering		After evisceration		After final chilling	
				Isolation	Species or PCRRFLP type of <i>C. jejuni</i>	Isolation	Species or PCRRFLP type of <i>C. jejuni</i>	Isolation	Species or PCRRFLP type of <i>C. jejuni</i>
May 10	I-1	—		—		—		—	
	II	—		—		—		—	
	III-1	+	L, H	+	L	+	L	—	
May 14	IV	—		—		—		—	
May 24	V	—		—		—		—	
	VI	—		—		—		—	
	VII	—		—		—		—	
May 31	VIII-1	+	D, N	+	N	+	N	—	
	IX	+	L	+	L, N	+	L, N	—	
July 10	X-1	+	A	+	J	—		+	J
	III-2	+	E, F	+	E, F	+	E, F	—	
	XI	—		+	A, E	+	A, E	—	
July 17	X-2	+	A, G	+	A	+	A	+	A
	I-2	—		+	G	—		—	
	XII	+	B, E, J	+	B, E	+	B, E	+	B
July 26	XIII-1	—		—		—		—	
	XIII-2	+	<i>C. C. coli</i>	+	<i>C. C. coli</i>	+	<i>C. C. coli</i>	+	C
	XIV-1	+	I	+	I	+	I	—	
Oct. 16	XV-1	+	K, M	+	M	+	M	—	
	XV-2	+	N	+	B	+	B	—	
	XIV-2	+	I	+	I, N	+	I, N	—	
Oct. 30	XVI	—		—		—		—	
	XVII	—		—		—		—	
	VIII-2	+	N	+	N	+	N	—	

¹⁾ —: *Campylobacter* spp. negative. +: *Campylobacter* spp. positive.

考 察

カンピロバクター食中毒における鶏の役割および食品安全委員会評価書で鶏肉へのカンピロバクター汚染の軽減対策として推奨されている区分処理の効果を確認するため今回の実験を実施した。

搬入群ごとに見ると24群中12群(50.0%)が*C. jejuni*を、1群(4.2%)が*C. jejuni*と*C. coli*を保菌していた。わが国の食鳥処理場搬入鶏群調査ではカンピロバクター保菌率は34~75%であり、さらに*C. jejuni*の保菌率が*C. coli*よりも高いとの報告がある^{1,8,10,11,13)}。われわれの成績も、過去の報告と同様であり、鶏は*C. jejuni*食中毒の汚染源となる可能性が高いと考えられた。

非汚染鶏群のみを、通常どおり処理した場合には、と体からカンピロバクターは検出されなかった。このことから、食鳥処理場に搬入される鶏が汚染していない場合には、食鳥処理場の機器の清掃・洗浄が適切であれば、処理場内からカンピロバクターの汚染は生じないことが判明した。これに対して汚染鶏群を処理した場合、その

と体からもカンピロバクターが分離されるとともに、その直後に処理される非汚染鶏群のと体からもカンピロバクターが分離された。分離株の遺伝子型別では直前に処理された汚染鶏群の盲腸内容物由来株と同一の遺伝子型を示すものが多かった。このことから、汚染鶏群の盲腸便中に生息するカンピロバクターが次に処理する鶏群のと体を2次汚染していることが確認された。

今回の拭き取り検査では、チラー通過後のと体のカンピロバクターの検出率が低かった。今回はチラー水の塩素濃度は測定していなかったが、処理場のマニュアルでは作業開始の濃度は150 ppm以上で作業中は50 ppm以上を保持することになっている。チラー水の塩素濃度を適切に保持すればチラー通過後のと体のカンピロバクター汚染を軽減することができると考えられた。

非汚染鶏群から処理する、いわゆる区分処理は2次汚染防止対策として有効であり²⁾、アイスランド、デンマーク、ノルウェー等では区分処理が実施されている⁷⁾。搬入前の養鶏場段階でカンピロバクター非汚染鶏群であるか、汚染鶏群であるか判明することは極めて難しい課

題であるが、食鳥処理場で非汚染鶏群を先に搬入・処理するという区分処理が可能となればカンピロバクター汚染のない衛生的な鶏肉を生産することも可能であることが示唆された。

要 約

カンピロバクター汚染がない食鳥と体を生産することを目的として、食鳥処理場で処理される鶏の保菌調査および処理と体の拭き取り検査を実施した。処理鶏24群中12群(50.0%)の搬入鶏120羽中34羽(28.3%)から*Campylobacter jejuni*が検出された。また、1群(4.2%)の搬入鶏5羽(4.2%)から*C. jejuni*と*C. coli*が同時に検出された。鶏群でみると13群が汚染鶏群、11群が非汚染鶏群であった。1日の処理で非汚染鶏群のみを処理した場合は、カンピロバクターはと体から分離できなかった。しかし、汚染鶏群を先に処理すると、と体が汚染されるとともに、施設を介して、その汚染が次に処理されると体を汚染していることが判明した。鶏肉へのカンピロバクターの交差汚染を防ぐためには区分処理をすることが有効であると思われた。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究補助金（平成24～26年度）「と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化とカンピロバクター等の制御に関する研究、分担研究：食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御、研究代表者：山本茂貴（平成24年度）、朝倉 宏（平成25～26年度）」によって実施した。

文 献

- Chuma, T., Makino, K., Okamoto, K. and Yugi, H.: Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broilers by using restriction fragment length polymorphism of flagellin gene. J. Vet. Med. Sci., **59**, 1011-1015 (1997).
- Hue, O., Le Bouquin, S., Laisney, M. J., Allain, V., Lalande, F. et al.: Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughter. Food microbial., **27**, 992-999 (2010).
- Jeong, K. C., Kang, M. Y., Heimke, C., Shere, J. A., Erol, I. et al.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from the gall bladder of inoculated and naturally-infected cattle. Vet. Microbiol., **119**, 339-345 (2007).
- 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**, 549-557 (2004).
- 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：モニタリング方法及び細菌検査法の解説，食鳥処理場におけるHACCP方式による衛生管理指針，p. 31-33, 東京(1992).
- Matsumoto, N., Taniwaki, T., Kinuta, M. and Murase, T.: Isolation of *Campylobacter jejuni* and coliform bacilli from bile and liver obtained from slaughter cattle in Western Japan. J. Food Prot., **71**, 1228-1231 (2008).
- 三澤尚明：食鳥処理場におけるカンピロバクター制御法の現状と課題。日獣会誌，**65**, 617-623 (2012).
- 森田幸雄，壁谷英則，石岡大成，坂脇廣美，長井 章ら：家畜および市販ひき肉における*Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella*の分布状況。日獣会誌，**57**, 393-397 (2004).
- Nachamkin, I., Bahachick, K. and Patton, C. M.: Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol., **31**, 1531-1536 (1993).
- 小野一見：市販鶏肉のカンピロバクター及びサルモネラ汚染状況と分離株の薬剤感受性。日獣会誌，**67**, 442-448 (2014).
- Ono, K. and Yamamoto, K.: Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama. Int. J. Food Microbiol., **47**, 211-219 (1999).
- Rosef, O.: Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from the gallbladder of normal slaughter pigs, using an enrichment procedure. Acta Vet. Scand., **22**, 149-151 (1981).
- Sasaki, Y., Tsujiyama, Y., Tanaka, H., Yoshida, S., Goshima, T. et al.: Risk factors for *Campylobacter* colonization in broiler flocks in Japan. Zoonosis Public Health, **58**, 350-356 (2011).
- 清水泰美，星野利得，石岡大成，森田幸雄，黒田 晃ら：食鳥処理場における細菌汚染調査。日獣会誌，**51**, 608-612 (1998).
- Stotland, E. I., Edwards, J. F., Roussel, A. J. and Simpson, R. B.: Bacterial microflora of normal and telangiectatic livers in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., **219**, 36-39 (2001).
- Wassenaar, T. M. and Newell, D. G.: Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 1-9 (2000).