

名古屋学芸大学大学院

論文要旨

2017 年度入学

栄養科学研究科 博士後期課程

栄養科学専攻

学籍番号 17201101

氏名 伊藤 智 印

[論文題目]

Campylobacter 属菌の定量的検出法開発と フードチェーン下流における生残実態の解明

(論文題目が外国語の場合は、和訳を付記すること。)

[要 旨]

背景および目的

Campylobacter 属菌による食中毒は先進国において主要な食中毒であり、日本の細菌性食中毒の中では、2016 年以降、発生件数が最も多く、直近の 5 年間では年間約 200 件、約 1,000~2,000 人の患者が報告されている。その主な原因は鶏肉であり、市販鶏肉は食鳥処理において、*Campylobacter* 属菌の汚染を高確率に受けると報告されている。カンピロバクター食中毒は低菌量の摂取で発症するとされ、汚染された鶏肉を非加熱又は加熱不足で喫食したか、調理中の取扱い不備で発生した交差汚染が原因で発生する。予防策を講じる上で消費段階の定量的リスク評価が必要であることから、食品を汚染する *Campylobacter* 属菌の継続的な定量測定が必要である。しかし従来の培養法では、食品中の夾雑物が定量値に影響することや結果が出るまでに日数がかかる、費用がかかるなど、課題が多い。これらのことから本研究では増菌培養後の食品試料液を DNA 抽出せずに、直接リアルタイム PCR 装置で検出 (Direct-qPCR 法) し、 C_T 値から増菌培養前の生菌数を推計できる定量法とその検出感度が高い新規サンプリング法 (wrap 処理) を開発すること、そして、フードチェーン下流における生残実態を解明し、リスクアセスメントを行う上で必要な伝播率や汚染率を明らかにすることを目的とした。

研究 1 Direct-qPCR 法による *Campylobacter* 属菌の定量的検出法の開発

C_T 値から増菌培養前の生菌数を推計するため、*Campylobacter jejuni* を鶏肉試料 (キモ、ササミ) に植菌し、植菌直後の試料中の生菌数と、この試料を 16 時間増菌培養した液の生菌数を培養法で定量し、増菌前後の生菌数を用いて増菌回帰式を作成した。また増菌後菌液の生菌数と Direct-qPCR に供し得られた C_T 値から PCR 回帰式を作成した。Wrap 処理でサンプリングしたとき、増菌効率が高いことから、増菌前の生菌数が 5 CFU/mL であっても C_T 値を得られた。Homogenization 処理では、 C_T 値から推計した増菌前生菌数と培養法で得られた生菌数は同等 ($p > 0.05$) だったが、 C_T 値検出率は 37.5% と低かった。これに対し Wrap 処理では培養法より平均生菌液濃度がキモで $0.72 \pm 0.42 \log \text{CFU/mL}$ 、

ささみで $1.10 \pm 0.51 \log \text{CFU/mL}$ 低値で推計されたが、 C_T 値検出率は 100% だった。培養法の生菌数と推計値の平均比（キモ：1.27、ササミ：1.40）を係数として推計値に乗じたところ、生菌数と推計値に有意差は無かった（キモ： $0.44 \pm 0.25 \log \text{CFU/g}$ 、 $p = 0.62$ 、ササミ： $0.52 \pm 0.34 \log \text{CFU/g}$ 、 $p = 0.29$ ）。したがって、推計された生菌数に係数を乗じれば培養法と同程度の生菌数を求めることができた。また、連続希釈による植菌実験の結果、Wrap 処理だと培養法の検出限界（ < 10 ）のサンプルからも検出可能だった。

研究 2 市販鶏肉中の *Campylobacter* 属菌の定量的検出

市販鶏肉（キモ、ササミ）に自然に汚染された *Campylobacter* 属菌を Direct-qPCR 法で検出したところ、検出率は Wrap 処理でサンプリングしたとき 85.7~100%、Homogenization 処理でサンプリングしたとき 30.4~35.7% だった。培養法は培地上に発育するコロニーが観察されたが、遊走していたり、コロニー数が少ないなどの理由からカウント不能のケースがあり、低菌量の定量は困難だった。しかし Wrap 処理と Direct-qPCR 法で定量を試みたところ Direct-qPCR 回帰式を用いて C_T 値から増菌後の生菌数を推計し、さらに、増菌回帰式を用いて増菌前の生菌数を推計することができた。

研究 3 調理モデル実験による *Campylobacter* 属菌の定量的検出

カンピロバクター食中毒予防対策を講じるため、調理段階の汚染実態を定量する必要がある。そこで Direct-qPCR 法を用いて調理モデル実験を行い、生残数を測定し、三次汚染や除菌・殺菌効果を数値化した。三次汚染調理モデルは二次汚染させた調理器具を用いて、食材・切り方を変えて行った。三次汚染率は食材や切り方に関わらずまな板で 3.07~5.38% で最も高かった。ほうれんそうでは、茹での方が生より汚染率が高かった。汚染発生率はまな板が最も高かった。除菌・殺菌モデルは、殺菌剤や拭き取り方を変えて行った。除菌・殺菌モデルでは、菌液を吸い取り、殺菌剤噴霧後に拭き取ることで、トレイの生残数が検出されなくなった。しかし全てのふきんで *C. jejuni* の生残が確認され、調理時の取り扱いに注意が必要であることが分かった。殺菌剤について、電解水のほうがアルコールより生残数が少なくなった。Direct-qPCR 法は汚染リスクアセスメントに有効であること、加えて食中毒の原因食品調査、汚染伝播経路調査に有効であることが示唆された。

結論

以上の結果より、Wrap 処理でサンプリングした試料を、増菌後 Direct-qPCR 法で C_T 値を計測すれば、低菌量汚染の市販鶏肉でも *Campylobacter* 属菌の検出、定量が可能である。調理モデル実験したサンプルを本法で定量した結果から、三次汚染伝播率や除菌・殺菌後の生菌率などフードチェーン下流における生残実態を解明した。本法は *Campylobacter* 属菌以外の食中毒菌や、鶏肉以外の食材にも応用可能である。今後本法を定量的汚染実態調査に活用すれば、ベースラインデータとして汚染伝播実態が把握され、効果的なリスク低減措置が開発され、カンピロバクター食中毒の低減に資すると考えられる。