

博士学位論文

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

2023年2月

名古屋学芸大学大学院

栄養科学研究科

伊藤 智

目次

第1章 緒論

1-1 <i>Campylobacter</i> 属菌	1
1-2 <i>Campylobacter</i> 食中毒	1
1-3 <i>Campylobacter</i> 食中毒の予防対策	4

第2章 Direct-qPCR 法による *Campylobacter* 属菌の定量的検出法の開発

2-1 目的	7
2-2 方法	
2-2-1 培養法による増菌培養前後の生菌数の測定	8
2-2-2 Wrap 処理	9
2-2-3 Direct-qPCR 法の手順	12
2-2-4 Direct-qPCR 法と培養法の生菌数の比較	12
2-2-5 統計解析	12
2-3 結果	
2-3-1 培養法で得られた増菌前後生菌数の検出率、定量率、回帰式	12
2-3-2 Direct-qPCR 法で得られた C_T 値と培養法で得られた生菌数の 相関関係と回帰式	19
2-3-3 Direct-qPCR 法による推定生菌数と培養法による生菌数の比較	21
2-4 考察	25

第3章 市販鶏肉中の *Campylobacter* 属菌の定量的検出

3-1 目的	26
3-2 方法	
3-2-1 培養法による市販鶏肉のサンプリング法、及び培養法による 生菌数の測定	26
3-2-2 Direct-qPCR 法の手順	26
3-3 結果	
3-3-1 市販鶏肉の <i>Campylobacter</i> 属菌検出及び定量	27

3-4 考察	33
第4章 調理モデル実験による <i>Campylobacter</i> 属菌の定量的検出	
4-1 目的	34
4-2 方法	
4-2-1 試料と <i>C. jejuni</i> 汚染試料の調製	35
4-2-2 三次汚染モデル (model 1)	35
4-2-3 除菌・殺菌モデル (model 2)	37
4-2-4 三次汚染調理モデルにおける <i>C. jejuni</i> の定量	39
4-2-5 除菌・殺菌モデルにおける <i>C. jejuni</i> の定量	39
4-2-6 推計された増菌培養前生菌数の妥当性	40
4-2-7 統計解析	40
4-3 結果	
4-3-1 C_T 値から推計された増菌培養前生菌数の評価	40
4-3-2 三次汚染調理モデル (model 1)	45
4-3-3 除菌・殺菌モデル (model 2)	49
4-4 考察	52
第5章 総合考察	54
参考文献	57
謝辞	62

略語

ATCC	American Type Culture Collection
CFU	Colony Forming Unit
C _T	Cycle Threshold
ISO/TS	International Organization for Standardization Technical Specification
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
mCCDA	Modified Charcoal Cepoperazone Deoxycholate Agar
MGB	Minor Groove Binder
MPN	Most Probable Number
NIHSJ	National Institute of Health Science Japan
PBS	Phosphate-Buffered Saline
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
VBNC	Viable But Non Cultureable

第1章 緒論

1-1 *Campylobacter* 属菌

Campylobacter 属は1963年、シーボルトとヴェロンにより、当時 *Vibrio* 属に分類されていた *V. fetus* および *V. bubulus* の2菌種をもって初めて提唱された菌属である。その後、2020年11月現在、*Campylobacter* 属菌は33菌種に分類されている (LPSN: Genus *Campylobacter*, 2020)。

Campylobacter 属菌は幅 $0.2\sim 0.8\mu\text{m}$ 、長さ $0.5\sim 5\mu\text{m}$ 、1~数回螺旋しているグラム陰性菌であり、一端または両端に鞭毛を有する。鞭毛を使用してコルクスクリュー様(らせん状)の回転運動をする。5~10%酸素存在下でのみ増殖可能な微好気性菌である(日本食品衛生協会, 2018)。*Campylobacter* 属菌は、多くの哺乳類及び鳥類の消化管、生殖器、口腔内に広く分布している。ヒトの感染症は主に下痢症や菌血症で、臨床材料から主に検出される菌種に、*Campylobacter jejuni*、*C. coli*、*C. lari*、*C. upsalitis*、*C. jejuni* がある(松本, 2019)。

1-2 *Campylobacter* 食中毒

Campylobacter 属菌による食中毒は厚生労働省の食中毒統計調査において、近年、患者数、事件数ともに細菌の中で多く発生しており (Figure 1)、2003年から2021年まで19年連続で細菌性食中毒の発生件数1位を継続している。多くの先進諸国において *Campylobacter* 食中毒は増加傾向にあり、地球規模では、毎年4~5億人の感染者があると推測されている (Ruiz-Palacios, 2007)。また、*Campylobacter* 食中毒は低菌量の摂取で発症するとされ (Teunis, 2005)、集団発生例の報告も多い。*Campylobacter* 属菌に汚染された食品を喫食後1~7日(平均3日)で、下痢、腹痛、発熱、頭痛、全身倦怠感等の症状が認められる(食品安全委員会, 2006)。*Campylobacter* 食中毒患者の多くは自然治癒し、予後も良好で特別な治療を必要としない場合が多い。*Campylobacter* 食中毒による死亡例はまれであるとされ、幼児、高齢者又は免疫の低下した者では、致死となる場合がある(食品安全委員会, 2015)。致死率は低く、致死となった事例の大部分は高齢者又は依存症の場合であったとされ、致死率を0.024%と推定した海外の報告がある (Magaz-Martinez, 2016)。合併症としては、敗血症、肝炎、胆管炎、髄膜炎、関節炎、ギラン・バレー症候群 (Guillain-Barre Syndrome) などを起こすことがある。ギラン・バレー症候群は、手足のしびれ、顔面麻痺、歩行困難などを引き起こす末梢

神経障害であり、原因の約3割は *C. jejuni* によるものとされている。食品由来疾患は、総体的に見れば死亡率は高くないものの、患者の健康的な生活の質を低下させ、公衆衛生上重要な懸案事項と考えられている。集団の健康状態を示す指標の1つである DALYs (disability-adjusted life years : 障害調整生存年) の日本における2011年の試算結果として、食品由来の *C. jejuni* / *coli* による感染症の DALYs は 6,064 DALYs と推計された (厚生労働省, 2022)。なお、*Salmonella* sp. は 3,145 DALYs、腸管出血性大腸菌は 463 DALYs、ノロウイルスは 515.3 DALYs と推計されており、調査した感染症の中で最も大きな疾病負荷になっている。このように *Campylobacter* 食中毒は、発生件数の多さのみならず、病態の深刻さからも重要性が増しており、その予防対策の構築が急務とされる。

Campylobacter 属菌のうち食中毒の原因となる主な菌種は *C. jejuni* 及び *C. coli* であり、1982年に厚生省(現 厚生労働省)においてこの2菌種が食中毒菌に指定されている。*C. jejuni* は哺乳動物の体温(37℃)よりも鳥類の温度帯(42℃)でよく増殖することから、高温性 *Campylobacter* (Thermophilic *Campylobacter*) と呼ばれている (三澤, 2013)。*C. coli* は形態、発育性、生化学的性状が *C. jejuni* に類似する。*C. coli* は馬尿酸塩加水分解試験陰性である点で、*C. jejuni* と鑑別が可能である。*C. jejuni* 及び *C. coli* は家畜、家きん、伴侶動物や野生動物などの腸管内に定着し、保菌動物自身は発症することなく宿主との共生関係を保っている。*C. jejuni* 及び *C. coli* の鶏の保菌率は、その他の動物における保菌率から比較すると非常に高いが、鶏における *Campylobacter* 属菌の分離率は、0~100%とバラつきが大きい。また豚では *C. coli* が、牛では *C. jejuni* が高率に分離される。

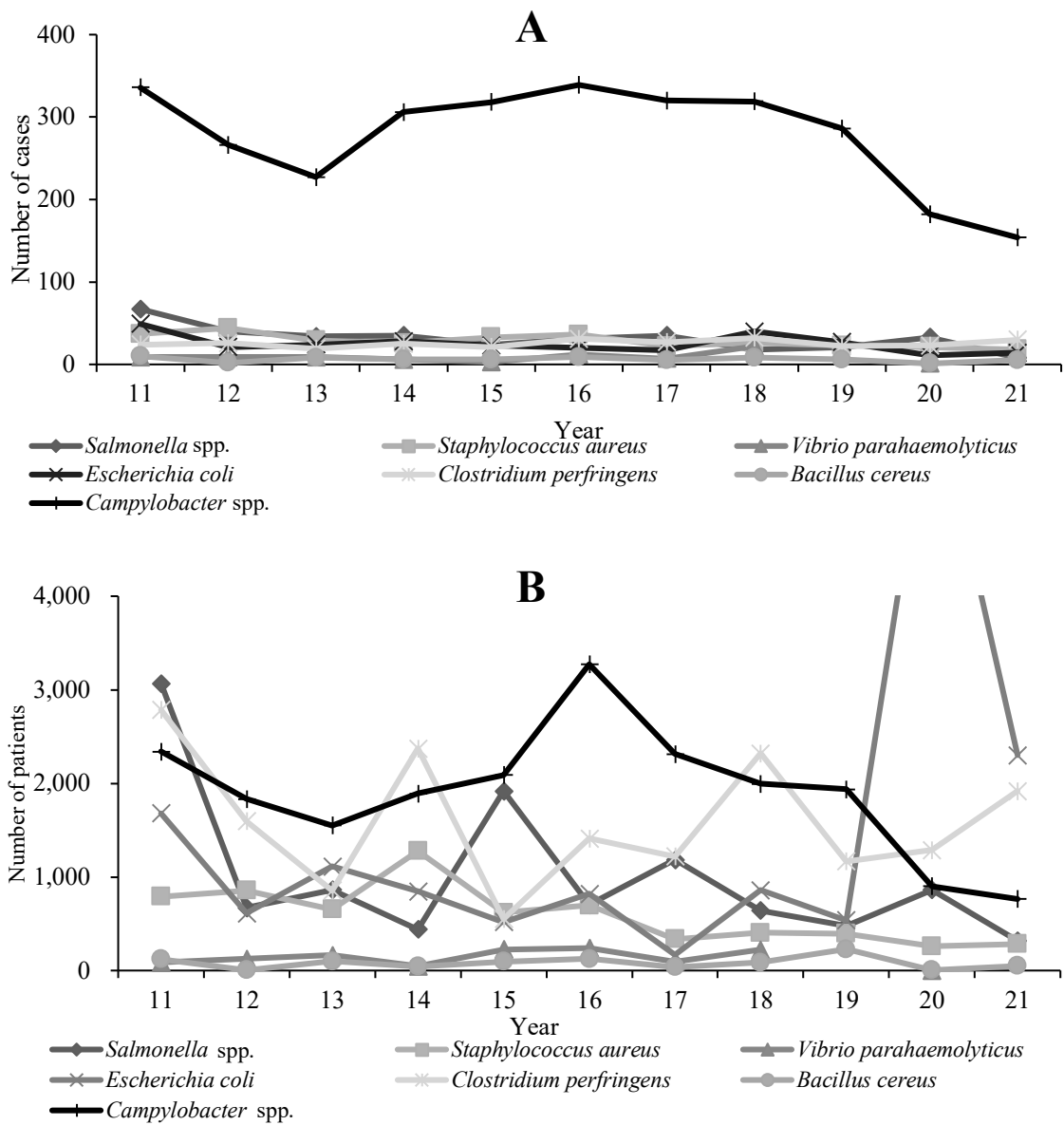


Figure 1. Distribution of annual trends in bacterial food poisoning

A: Number of cases

B: Number of patients

1-3 *Campylobacter* 食中毒の予防対策

Campylobacter 食中毒の発生を防止するためには、食鳥の処理から食鳥肉の加工調理、消費に至る工程などフードチェーンの各段階において、微生物の交差汚染防止を図り、消費前の十分な加熱による微生物低減対策を講じることが重要である。

生産段階では食鳥処理場の構造設備基準や衛生管理基準を定めた「食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律」（1991年）に基づいて予防対策が行われている。さらに「食鳥処理場における HACCP 方式による衛生管理指針」（1992年）で HACCP を行う場合の基準を明確にし、食鳥肉の微生物汚染対策のより一層の充実を図った。2021年6月までに全ての食鳥処理場で HACCP に沿った衛生管理の実施が義務付けられ、食中毒統計による *Campylobacter* 食中毒事件数は901件（2020年）、764件（2021年）と1,000件以下となったが、依然として他の細菌性食中毒と比較して事件数が多い。2021年食中毒発生事例（厚生労働省, 2022）^①で、病因物質が *C. jejuni / coli* である発生事例（154件）のうち原因食品が判明した事例（48件）の中で、未加熱調理（刺身、たたき、マリネ）が35.4%（17件）、加熱調理（加熱不十分、低温調理など）が64.6%（31件）だった。市販鶏肉の汚染実態を調査した報告（小野, 2014）^②で、市販鶏肉の61.0%（94/154検体）から *Campylobacter* 属菌が分離された。汚染菌数は、1.5～1.9 log MPN/100g の検体が13.6%（21/154）、2.0～2.9 log MPN/100g の検体が19.5%（30/154）、3.0～3.7 log MPN/100g の検体が16.9%（26/154）、>3.7 log MPN/100g の検体が9.7%（15/154）、検出限界未満の検体が1.3%（2/154）だった。このことから、生産段階での *Campylobacter* 属菌汚染低減措置のみでは、*Campylobacter* 食中毒を十分に予防することはできず、生産段階以降のフードチェーン段階での予防対策が必要である。

生産段階以降の食中毒予防対策として、調理段階の交差汚染低減が有効とされる（長谷川, 2013）。交差汚染とは、病原菌の汚染度が高いものが、汚染度の低いものに接触することで伝播する汚染で、ヒトや食品、調理器具を介しておこる。例えば、生産段階で微生物汚染した生肉を下処理した場合、使用したまな板、包丁、手は微生物に交差汚染される。それらを洗浄・交換せず、そのまま次の調理で使用した場合、調理後の食材が汚染される。この汚染した食材が、加熱後の食材や生で喫食する食材であった場合、生肉から汚染伝播した病原菌がヒトの体内に感染し、食中毒が発生する原因となる。交差汚染を未然に防止するためには、食品取扱区域を清潔区域、汚染区域など区域分けする、使用する食品ごとに調理器具を使い

分ける、手指や器具、容器、食器などを洗浄・殺菌するなどの一般衛生管理の徹底が必要とされる。このような一般衛生管理活動を評価し、改善やより効果的な衛生管理を行ううえで、汚染した *Campylobacter* 属菌を検出定量し、汚染伝播率を算出するなど汚染伝播の実態を見える化することが有効であり、リスクマネジメントに資するリスクアセスメントデータとして役に立つ。一般に *Campylobacter* 属菌は International Organization for Standardization Technical specification (ISO/TS) 10272-2 (ISO, 2006) に定める定量法が用いられることが多い。しかし、*Campylobacter* 属菌は大気中に暴露されると、急速に菌形態をらせん状から球状に変化させ、速やかに VBNC (Viable But Non Culturable cells: 生きているが、人工培地で培養できない仮死状態) となることや (Hong, 2007)、寒天培地上で遊走するので (Moore, 2001)、培養条件を標準化することが難しく (Ricke ら, 2019、Yoymi ら, 2017)、培養法で菌数を計測することは難しい。その代替法として real-time PCR (qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction) を用いた分子生物学的手法が提案されてきた (Kojima ら, 2016、Toplak ら, 2012、Bojan ら, 2017、Sabaike ら, 2018)。qPCR 法は培養法より感度が高く、迅速に検出できる。しかし、qPCR 法は生菌と死菌の区別がつかないことや食品混合サンプルが PCR 反応を阻害すること、DNA 抽出に機器や手技が必要であることなどが課題とされてきた。よって、食品成分等の影響が少ないサンプリング法の開発、死菌の影響を最小にする工夫や簡便な qPCR 法の開発が求められている。

名古屋学芸大学環境衛生学研究室では 2016 年から迅速かつ簡便な *Campylobacter* 属菌の検出・定量法の開発に取り組んできた。具体的には増菌培養と PCR 反応を組み合わせた検出的定量法で、検出感度や定量精度向上のための改良を行うとともに、食環境中における *Campylobacter* 属菌の生残実態を解明するツールとしての実用性の検証を行ってきた。石田は公定法では 3 日以上かかる *C. jejuni* の検出を 1.5 日に短縮し、1.0 log CFU/mL の *C. jejuni* の検出が可能であると報告した (石田, 2017) が、開発した手法は熟練した実験操作技術が必要で、実験者のスキルによる誤差に問題があった。その問題解決のため浅野は、実験操作の簡便化と検出感度向上という課題に取り組み qPCR 法をインターカレーション法からハイブリダイゼーション法に変更するとともに、試料菌液から DNA 抽出なしで qPCR が可能な PCR 反応阻害耐性のある試薬を選択した。具体的にはハイブリダイゼーション法のプライマー・プローブとして TaqMan®MGB 遺伝子発現キットや LightMix®Modular *Campylobacter*

を用いることやPCR反応阻害耐性のあるKAPA 3G Plantを用いることで、DNA抽出操作を省略、かつ、再現性、簡便性、迅速性を向上させ、リスクアセスメントに必要なベースラインデータ収集にqPCR法が活用可能であることを報告した(浅野,2021)。しかし、食品残渣が含まれる検体中の*Campylobacter*属菌を定量するときは食品成分が増菌培養やPCR反応に影響を及ぼすことがあるため、サンプルの前処理方法などの工夫や検討が必要だった。

本研究では、qPCR法を用いて迅速かつ簡便に低菌量の定量が可能な手法を開発し(第2章)、その手法で市販鶏肉中の*Campylobacter*属菌の検出定量を行い、検出感度と精度を評価した(第3章)。そしてフードチェーン下流の調理段階における*Campylobacter*属菌の生残及び汚染伝播実態を明らかにするため、開発した手法を用いたモデル調理実験を構築し、汚染伝播率や除菌・殺菌による菌の生残を明らかにした(第4章)。

今後本研究で開発したqPCR法を用いて、様々な場面を想定したモデル調理実験の定量データを収集することで、リスクアセスメントに必要なベースラインデータを蓄積し、食中毒予防法構築の一助とする。

第2章 Direct-qPCR法による *Campylobacter* 属菌の定量的検出法の開発

2-1 目的

市販鶏肉はその生産段階で、*Campylobacter* 属菌の汚染を高確率に受けると報告されている (Igimi ら, 2012、Kojima ら, 2016、Misawa, 2012)。食中毒の原因は患者喫食調査及び疫学調査結果によると、消費段階で *Campylobacter* 属菌に汚染された鶏肉を生の状態及び加熱不足で喫食、または調理中の取扱い不備により汚染された鶏肉の交差汚染とされる (Callicott ら, 2008、日本食品衛生協会, 2018、Nauta ら, 2005、Yokoyama, 2017)。

生産段階、食鳥処理段階では、*Campylobacter* 属菌の汚染を十分に防ぐことはできない (Kittl ら, 2013)。したがって *Campylobacter* 食中毒を予防するためには、消費段階での加熱調理処理後の生残菌数や調理操作時の器具を介した汚染伝播率の定量的リスク評価データをベースにしたリスクアセスメントが必要である。また、*Campylobacter* 食中毒は数百～数千個の低菌量で発症するので (Hayashi ら, 2013、Teunis ら, 2005)、食品中の低菌量の *Campylobacter* 属菌を迅速に高感度で検出できる手法が望まれる。

Campylobacter 属菌の検出・定量法は ISO/TS 10272-1、10272-2 (以下、培養法) があり、日本では *Campylobacter jejuni/coli* 標準試験法 (国立医薬品食品衛生研究所, NIHSJ-02:2019) が広く用いられている。しかし時間がかかること (菌種同定までに 5 日程度)、培養条件が十分選択的でなければならないこと (Teunis ら, 2005)、VBNC や遊走する特性 (Igimi, 2012) などで、培養法による生菌数測定は難しい。

これまでに名古屋学芸大学環境衛生学研究室では、フードチェーン下流における *Campylobacter* 属菌の生残及び伝播の実態を明らかにするために、迅速・簡便に低菌量の定量が可能な手法を開発してきた。qPCR で得られる C_T 値は試料液の菌液濃度と反比例の関係性にあり、 C_T 値と菌液濃度で検量線を作成することで、 C_T 値から菌数を算出する回帰式を用いて、未知の菌液濃度が測定できる。しかし、フードチェーン下流で鶏肉等を汚染している *C. jejuni* 属菌は低菌量 ($10^0 \sim 10^2$ CFU/g) であるため、qPCR で定量可能な菌数にするためには増菌が不可欠となる。そこで石田は増菌後の菌数から増菌前の菌数を求めるための増菌検量線を作成するとともに、 C_T 値から菌数を算出する回帰式を作成し、 10^1 CFU/mL

以上の *C. jejuni* 菌液であれば、増菌前の *C. jejuni* 菌量を計測可能であること、増菌時間は16時間が最適であることを明らかにした(石田, 2017)。しかし、本法は増菌培養後に DNA 抽出するため、設備や操作者の技術が必要であることが課題だった。そこで、浅野は DNA を抽出せず増菌培養後の菌液を直接 PCR 反応に供する Direct-qPCR 法を採用、検出感度を上げるため、インターカレーション法からハイブリダイゼーション法に変更した。PCR 反応試薬に PCR 反応阻害耐性のある KAPA 3G Plant、プライマー/プローブに LightMix®Moduler *Campylobacter* や TaqMan®MGB 遺伝子発現キットを用いて、*C. jejuni* 検出定量できる方法を確立させた。(浅野, 2021)。しかし、鶏肉中の *C. jejuni* 菌量を検出定量するとき、 C_T 値が高値になる傾向がみられるなど課題が残った。これは食品成分の夾雑物(たんぱく質や無機成分など)がプライマーの特異性低減や DNA ポリメラーゼ反応阻害など影響したことによるものと考えられた(Schrader, 2012)。

市販鶏肉の *Campylobacter* 属菌は、主に表面を汚染し、内部はほとんど汚染されていない(鶏モモ肉の汚染率は、表面 66% (生菌数の中央値: 2.4 log CFU/g)、内部 27% (0.3 MPN/g 未満))(Kathrin ら, 2006)。そこで鶏肉表面を紙媒体で包み込み *Campylobacter* 属菌を回収するサンプリング処理(Wrap 処理)を開発した。我々は Wrap 処理でサンプリングすると、従来の処理(Homogenization 処理)より増菌効率が向上することを明らかにした(伊藤ら, 2019)。Wrap 処理は食品表面に分布する食品表面の *Campylobacter* 属菌を補足しやすく、食品に含まれる増菌阻害物質が混入しにくい。そこで Wrap 処理でサンプリングした試料を増菌培養し、qPCR 反応で C_T 値を検出する qPCR 法を開発した。本 qPCR 法は手順を簡便化、作業時間を削減するため、DNA 抽出せずに、試料液を直接 PCR 反応に供する「Direct-qPCR 法」である。

本章では食品中の *Campylobacter* 属菌を定量的に検出する Direct-qPCR 法について紹介するとともに、Wrap 処理の検出精度や増菌培養効率を Homogenization 処理と比較した。また、Direct-qPCR 法で得られた C_T 値から推計された増菌前生菌数と培養法で測定した生菌数と比較し、Direct-qPCR 法の定量精度を評価した。

2-2 方法

2-2-1 培養法による増菌培養前後の生菌数の測定

サンプリング処理が増菌に及ぼす影響を調べるため、*Campylobacter* 属菌標準菌を植菌した鶏肉（キモとササミ）を試料とし ISO/TS 10272-1、10272-2 を一部変更した方法で *Campylobacter* 属菌を検出定量した（以下、培養法）。

鶏肉を植菌した標準菌は、*Campylobacter* 属菌の中で食品汚染率の高い *Campylobacter jejuni* (ATCC 29428) を用いた (Scherer ら, 2006)。標準菌は使用するまで-80°Cでマイクロバンク（イワキ株式会社、東京）に保管した。標準菌は Preston *Campylobacter* selective enrichment broth（以下、プレストン培地）で 37°C、24 時間増菌培養したものをリン酸緩衝液（0.1 mol/L Phosphate-Buffer Saline, pH7.4, 以下、PBS）で希釈して実験に供した（以下、標準菌液）。

鶏肉試料（6 パックのキモ：340～390 g、12 パックのササミ：330～380 g）は神戸市内の市販店で購入後、-20°Cで実験に供するまで冷凍保存し、実験に使用する前に 4°Cで緩慢解凍した。解凍後の鶏肉試料からは *Campylobacter* 属菌は検出されず、一般生菌数は、キモで 3.71 log CFU/g、ササミで 4.30 log CFU/g であり、鶏肉小売用の回帰式作成用の接種試料として適していた (Ueno ら, 1995)。鶏肉試料は 50¹、50²、50³、50⁴、50⁵ 倍に段階希釈した標準菌液に 1 分間浸漬して植菌し、10 分間ステンレス網（130 mm × 190 mm）の上に静置した。パックあたり 1～5 個の試料を前述の方法で植菌後、24 個のキモと 29 個のササミを実験に供した。植菌後の試料 25 g にプレストン培地 100 mL を加え、ストマッカー（E-Mix primo : AS ONE）で均一化して試料液とした（以下、Homogenization 処理）(Figure 2)。

増菌前生菌数を測定するため、試料液 0.1 mL (Figure 2 (a)) を mCCDA 寒天培地に塗抹し、N₂ : 83%、O₂ : 6%、CO₂ : 11%に調整したマルチガスインキュベーター（MCO-5MUV : Panasonic）で 42°C、48 時間微好気培養した。培養後、*Campylobacter* 属菌を疑うコロニーをカウントし、増菌培養前生菌数とした (Figure 3)。

試料液 (Figure 2 (a)) を密栓し、37°C、16 時間培養した増菌培養液中の菌数を上記と同じ手順でカウントし、増菌培養後生菌数とした (Figure 3)。得られた増菌前・増菌後生菌数から検出率、定量率及び、回帰式（以下、増菌回帰式）、相関係数を解析した。

2-2-2 Wrap 処理

食品試料に含まれる増菌阻害物質及び PCR 反応阻害物質の影響を減少するため、

Campylobacter 属菌が多く存在する食品表面の微生物を回収するサンプリング法(以下、Wrap 処理)を検証した。本法を評価するため、標準菌を植菌した鶏肉試料 25 g をシート (パルプ 100%、110×110 mm、イデシギョー株式会社) で包み 10 分後、シートを既成プレストン 培地 (プチット-カンピロ、日研生物医学研究所) と混和、指で 1 分間揉み均一化して試料 液を調製した (Figure 2, Sample solution (b))。試料液中 (Figure 2 (b)) の *Campylobacter* 属 菌の生菌数、増菌培養後の生菌数は Homogenization 処理と同じ手順 (Figure 3) で計測し、 検出率、定量率を算出し、増菌回帰式を作成した。

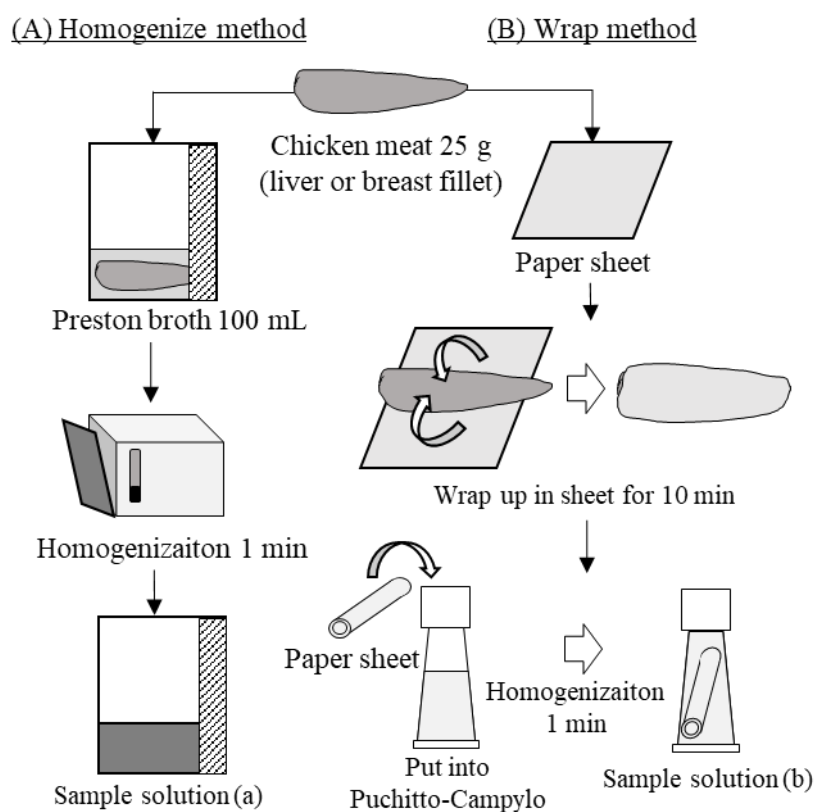


Figure 2. Procedure of sample solution preparation from chicken meat using the homogenization procedure (A) and wrap procedure (B).

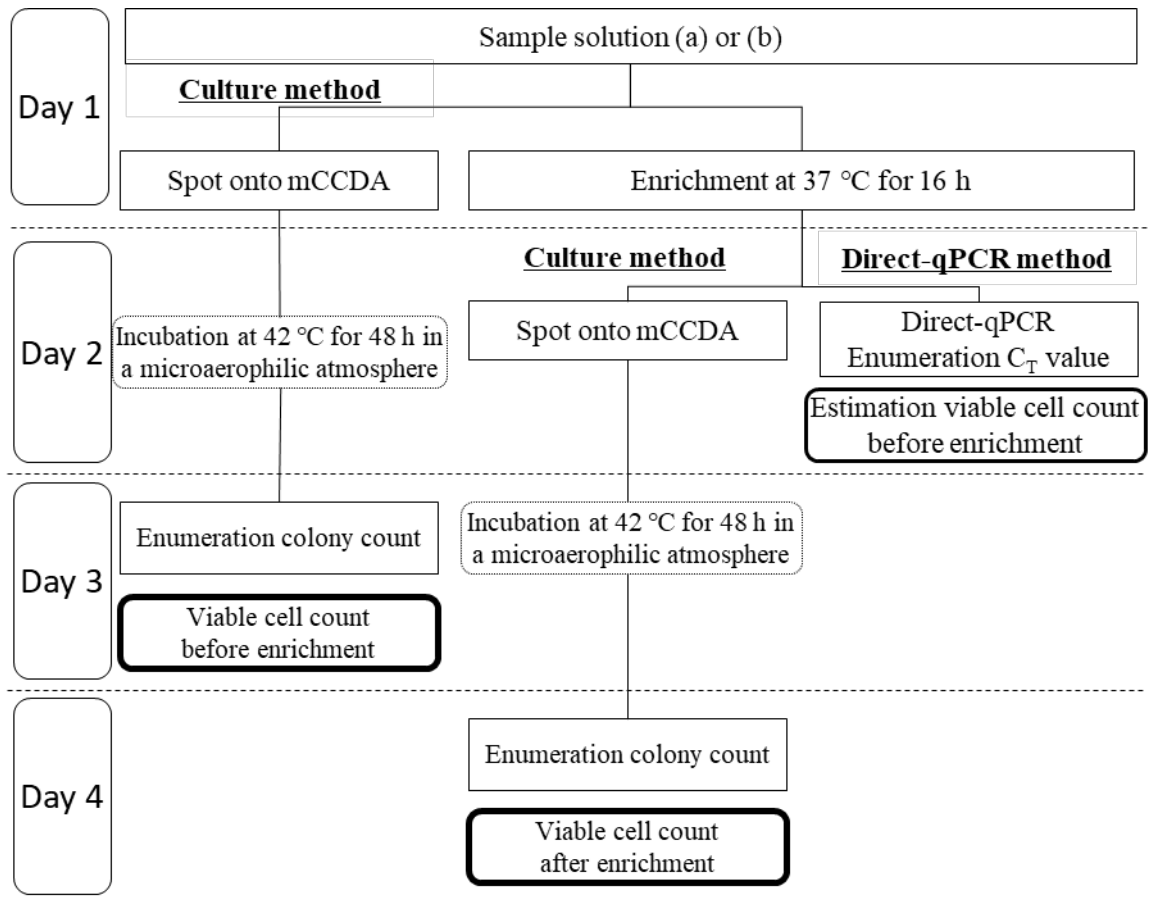


Figure 3. Procedure of calculating viable cell count from bacterial enrichment culture using the culture method and direct-qPCR method.

2-2-3 Direct-qPCR 法の手順

増菌培養後の *C. jejuni* 試料液を DNA 抽出せずにそのまま PCR 反応に供する（以下、Direct-qPCR）ため、PCR 反応試薬に PCR インヒビターに耐性がある KAPA 3G Plant PCR Kits（KAPA BIOSYSTEMS）（以下、KAPA 3G Plant）を選定した。この KIT は PCR インヒビターに耐性を持つ KAPA3G Plant DNA Polymerase を含んでいる（Kapa Biosystems, 2016）。プライマー・プローブは *Campylobacter* 属菌の特異遺伝子の増幅配列を含む LightMix®Moduler *Campylobacter*（Roche Diagnostics K.K）を用いた。PCR mixture には、試料菌液 1 μ L と premix 15 μ L（DNA Polymerase 0.6 μ L, PCR Buffer 8 μ L, 1.5 mM MgCl₂ 0.8 μ L, LightMix®Moduler *Campylobacter* 0.5 μ L）を混合した。調製後の PCR mixture は LightCycler96（Roche Diagnostics K.K）を用いて PCR 反応に供した。PCR 反応は initial denaturation（初期変性）95°C で 15 秒行った後、増幅反応（annealing and extension 60°C で 15 秒、denaturation 95°C で 4 秒）を 50 サイクル行い、LightCycler96 付属の Software Vresion 1.1（Roche Diagnostics K.K）で解析し、C_T 値を検出した。

2-2-4 Direct-qPCR 法と培養法の生菌数の比較

標準液を植菌した鶏肉を Homogenization 処理、及び Wrap 処理でそれぞれサンプリングし、増菌培養後、Direct-qPCR 法及び培養法で C_T 値、及び生菌数（log CFU/mL）を得た。得られた C_T 値と生菌数から回帰式を作成した（以下、C_T 値回帰式）。前述の増菌前後の回帰式（増菌回帰式）及び C_T 値回帰式の 2 つの回帰式を用いて、C_T 値から試料液中の生菌数（増菌前生菌数）を推計した。推計した増菌前生菌数（log CFU/g）と培養法で測定した増菌前生菌数（log CFU/g）の分布を箱ひげ図で示した。

2-2-5 統計解析

回帰式、相関係数、箱ひげ図解析、t 検定は IBM SPSS statistics（version 27; SPSS INC.）を用いて解析した。培養法で得られた生菌数と C_T 値で推定された生菌数は、試料 1 g あたりの生菌数（CFU/g）で評価した。

2-3 結果

2-3-1 培養法で得られた増菌前後生菌数の検出率、定量率、回帰式

標準菌を植菌後 Homogenization 処理および Wrap 処理でそれぞれサンプリングした試料

中の *Campylobacter* 属菌濃度、 C_T 値を Table 1, 2、検出率、定量率を Table 3, 4 に示した。キモの検出率及び定量率は Wrap 処理では 100%、75.0%、Homogenization 処理では 95.8%、58.3%と Wrap 処理が Homogenization 処理より高値だった (Table 3)。ササミの検出率及び定量率は Wrap 処理で 100%、75.9%、Homogenization 処理では 100%、82.8%となり、Wrap 処理と Homogenization 処理は同等だった (Table 4)。

増菌前・増菌後の生菌数より作成した増菌回帰式を Figure 4 A~D に示す。相関係数は 0.85~0.93 だった。増菌前と増菌 16 時間後の生菌数の差 (増菌数) の平均値 (log CFU/mL) は、Wrap 処理のとき、キモで 3.16 ± 0.33 、ササミで 3.48 ± 0.47 だったが、Homogenization 処理のとき、キモで 0.81 ± 0.39 、ササミで 2.56 ± 0.32 だった。キモ、ササミともに Wrap 処理が Homogenization 処理より増菌数は高値だった。

Table 1. Number of viable *Campylobacter* spp. before and after enrichment culture of liver samples inoculated with standard *Campylobacter* spp. using homogenization and wrap procedures, and C_T values of the solutions after enrichment culture

Batch	Dilution rate ^a (times)	Before enrichment (log CFU/mL)		After enrichment (log CFU/mL)		C _T value	
		Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap
a	50	3.61	4.14	4.35	7.28	37.52	25.05
	500	2.82	3.34	3.00	6.78	38.91	29.29
	5000	2.30	2.87	NA ^b	6.31	NEG ^c	30.75
	50000	<10 ^d	2.28	ND ^e	5.36	NEG	32.00
b	50	3.61	4.50	4.11	6.84	37.09	27.28
	500	2.98	3.22	3.18	6.07	NEG	31.25
	5000	2.26	2.80	2.85	5.48	NEG	32.26
	50000	<10	<10	2.65	4.92	NEG	35.87
c	50	3.39	4.05	4.35	7.49	38.51	27.10
	500	2.56	3.15	3.80	6.48	38.51	30.95
	5000	<10	2.51	3.24	6.15	43.56	32.40
	50000	<10	<10	2.42	NA	NEG	33.69
d	500	2.90	3.22	NA	6.51	42.16	31.24
	5000	2.28	2.48	NA	6.04	NEG	33.20
	50000	<10	<10	2.85	4.61	NEG	36.00
	500000	ND	<10	NA	3.95	NEG	36.50
e	500	2.90	3.59	3.74	6.57	NEG	28.41
	5000	<10	2.45	<10	5.80	NEG	32.16
	50000	ND	<10	NA	4.38	NEG	36.58
	500000	ND	<10	NA	4.42	NEG	35.42
f	50	4.26	4.44	5.60	7.46	33.32	27.83
	500	2.99	3.53	3.96	6.34	36.97	28.82
	5000	2.15	2.86	3.45	5.86	NEG	31.33
	50000	<10	2.16	3.18	5.56	NEG	32.70

^a Dilution rate of inoculated standard bacterial solution.

^b Not available; colonies could be observed on the medium but could not be counted due to swarming.

^c Negative

^d The number of colonies was less than 10.

^e Not detected.

Table 2. Number of viable *Campylobacter* spp. before and after enrichment culture of breast fillet samples inoculated with standard *Campylobacter* spp. using homogenization and wrap procedures and C_T values of the solutions after enrichment culture

Batch	Dilution rate ^a (times)	Before enrichment (log CFU/mL)		After enrichment (log CFU/mL)		C _T value	
		Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap
a	50	4.10	4.32	6.76	7.61	30.83	27.71
	500	3.14	3.42	5.97	6.94	33.59	28.19
	5000	2.29	2.67	5.18	6.03	37.13	32.7
	50000	<10 ^b	<10	4.21	5.19	40.69	36.66
	500000	<10	ND ^c	3.39	4.22	NEG ^d	39.21
b	50	3.59	4.05	6.40	7.08	30.54	27.05
	500	2.78	3.46	5.73	6.75	33.9	28.35
	5000	1.98	2.42	5.04	5.76	36.04	32.58
	50000	<10	<10	4.09	5.41	38.11	34.12
	500000	ND	ND	2.98	3.86	NEG	38.42
c	50	4.07	3.38	6.56	7.07	28.63	25.91
	50	3.99	3.25	6.55	6.81	29.85	25.61
d	50	4.02	4.24	6.82	7.56	28.30	25.91
	50	4.12	3.86	6.87	7.08	27.97	27.28
e	500	2.00	<10	5.16	4.32	38.14	39.62
f	500	2.10	<10	5.12	4.54	37.60	38.32
g	50	3.31	3.09	5.26	6.18	36.20	32.65
h	50	2.88	<10	5.23	5.27	37.44	27.40
i	50	4.05	3.56	6.35	7.71	30.56	29.00
	500	2.56	2.59	5.16	6.79	40.17	39.04
j	500	2.75	3.06	5.14	6.41	27.94	34.17
k	50	4.22	4.12	6.50	6.23	30.83	25.06
	50	4.26	4.19	6.53	6.49	32.02	25.14
	50	3.19	3.30	5.40	5.92	33.85	26.79
l	50	4.26	4.47	6.51	7.78	30.72	26.95
	50	4.57	4.78	6.73	8.06	31.12	26.84
	500	4.07	4.10	6.33	7.69	34.65	27.71
	5000	2.31	2.88	4.83	6.60	37.59	31.20
	50000	<10	2.06	4.10	5.48	NEG	34.83

^a Dilution rate of inoculated standard bacterial solution.

^b The number of colonies was less than 10.

^c Not detected.

^d Negative.

Table 3. Detection and quantification rates and viable cell counts of *Campylobacter* spp. in liver samples inoculated with *C. jejuni* sampled using the homogenization and wrap procedures

Sampling method	Before enrichment		After enrichment	
	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap
Sample	24	24	24	24
Countable	14	18	15	23
Uncountable	7	6	8	1
Negative	3	0	1	0
Detection rate	-	-	95.8%	100%
Quantification rate	58.3%	75.0%	-	-
Viable cell count	3.05 ± 0.60	3.20 ± 0.71	3.85 ± 0.74	6.35 ± 0.63

Countable: The number of samples where the colonies could be counted.

Uncountable: The number of samples where colonies could be observed on the medium but could not be counted due to swarming, and the number of colonies being less than 10.

Detection rate: (countable + uncountable) / sample. Calculated using the results obtain after enrichment of the culture method.

Quantification rate: countable / true positive. Calculated using the results obtain before enrichment of the culture method.

Viable cell count: average ± SD.

The viable cell counts before and after enrichment culture of chicken samples inoculated with the standard bacterial suspension sampled using the homogenization and wrap procedures are shown in Table 1.

Table 4. Detection and quantification rates and viable cell counts of *Campylobacter* spp. in breast fillet samples inoculated with *C. jejuni* sampled using the homogenization and wrap procedures

Sampling method	Before enrichment		After enrichment	
	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap
Sample	29	29	29	29
Countable	24	22	29	29
Uncountable	4	5	0	0
Negative	1	2	0	0
Detection rate	-	-	100%	100%
Quantification rate	82.8%	75.9%	-	-
Viable cell count	3.36 ± 0.83	3.51 ± 0.71	5.55 ± 1.05	6.31 ± 1.13

Countable: The number of samples where the colonies could be counted.

Uncountable: The number of samples where colonies could be observed on the medium but could not be counted due to swarming, and the number of colonies being less than 10.

Detection rate: (countable + uncountable) / sample. Calculated using the results obtained after enrichment of the culture method.

Quantification rate: countable / sample. Calculated using the results obtained before enrichment of the culture method.

Viable cell count: average ± SD. The viable cell counts before and after enrichment culture of chicken samples inoculated with the standard bacterial suspension sampled using the homogenization and wrap procedures are shown in Table 2.

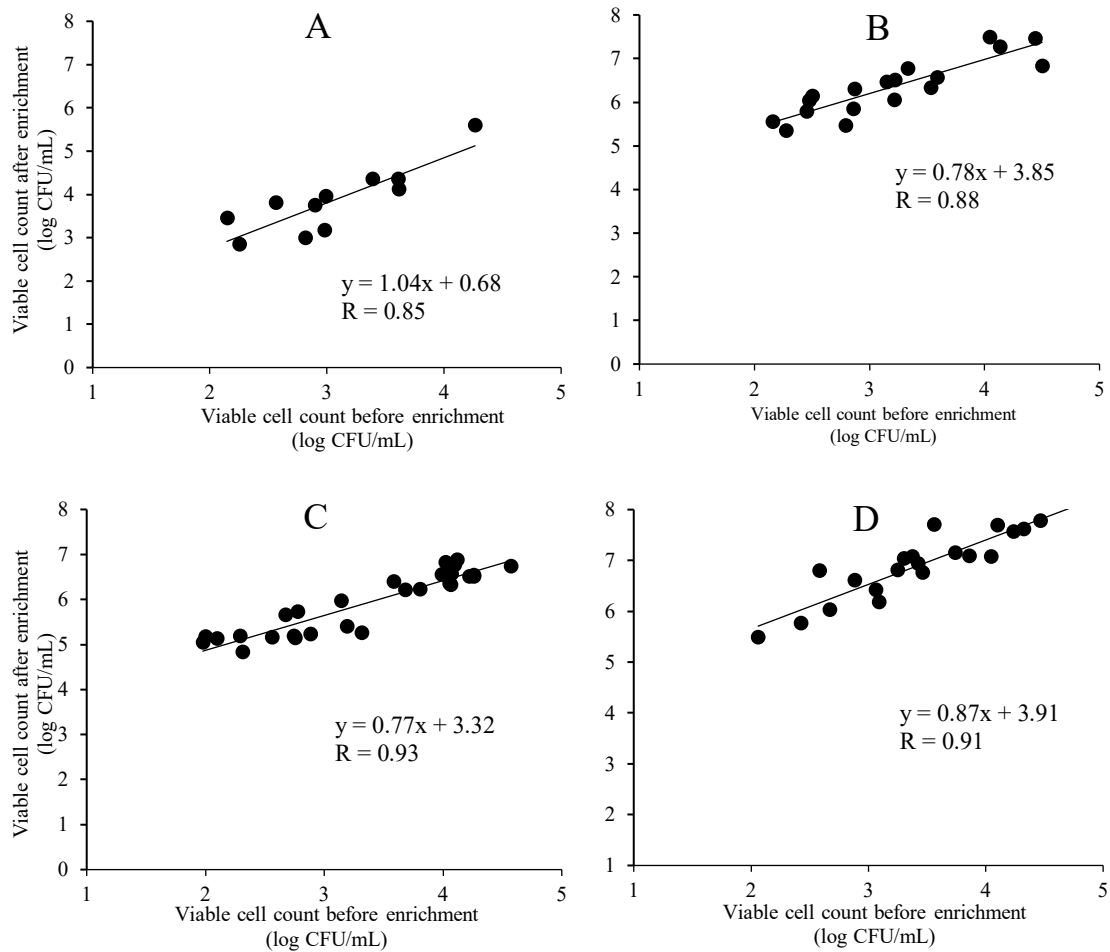


Figure 4. Distribution of viable cell counts before and after enrichment culture of chicken samples inoculated with *C. jejuni* (ATCC 29428) suspension.

Samples were prepared from livers inoculated with *C. jejuni* suspension using the homogenization procedure (A) and wrap procedure (B). Samples were prepared from breast fillets inoculated with *C. jejuni* suspension using the homogenization procedure (C) and wrap procedure (D).

The viable cell counts before and after enrichment culture of chicken samples inoculated with the standard bacterial suspension sampled using the homogenization and wrap procedures are shown in Tables 1 (liver) and 2 (breast fillet).

2-3-2 Direct-qPCR 法で得られた C_T 値と培養法で得られた生菌数の相関関係と回帰式

Homogenization 処理と Wrap 処理でサンプリングした試料に対する Direct-qPCR 法の C_T 値検出率を Table 5 に示した。Wrap 処理ではキモ、ササミともに、C_T 値検出率は 100% だった。増菌後の生菌数と C_T 値の回帰式を Figure 5 A, B に示した。相関係数はキモで 0.95、ササミで 0.91 と高い相関が認められ、サンプリング法による C_T 値のバラつきは無かった。グラフは示していないが、試料部位別、及びサンプリング法別にプロットした場合でも、高い相関が認められた（キモ：Homogenization 処理 R = 0.81、Wrap 処理 R = 0.94、ササミ：Homogenization 処理 R = 0.92、Wrap 処理 R = 0.80）。

Table 5. Detection rate of C_T value by the direct-qPCR in enrichment sample of liver and breast fillets inoculated with *C. jejuni* sampled using the homogenization and wrap procedures

Chicken meat part	Liver		Breast fillet	
	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap
Sample	24	24	29	29
Positive	9	24	26	29
Negative	15	0	3	0
Detection rate	37.5%	100%	89.7%	100%

Positive: The number of samples for which C_T values could be detected.

Negative: The number of samples for which C_T values could not be detected.

Detection rate: positive / sample

The viable cell counts before and after enrichment culture of chicken samples inoculated with the standard bacterial suspension sampled using the homogenization and wrap procedures are shown in Tables 1 (liver) and 2 (breast fillet).

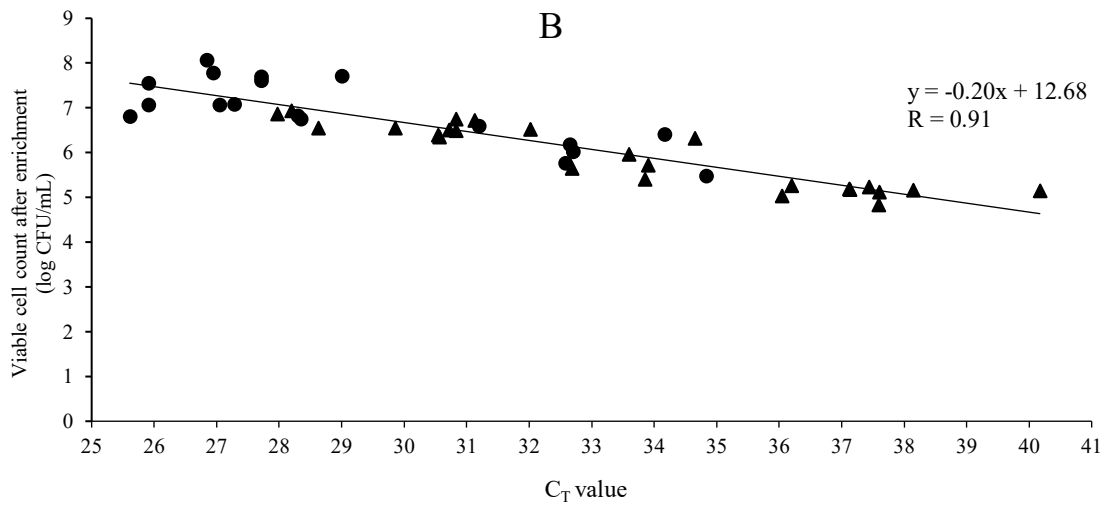
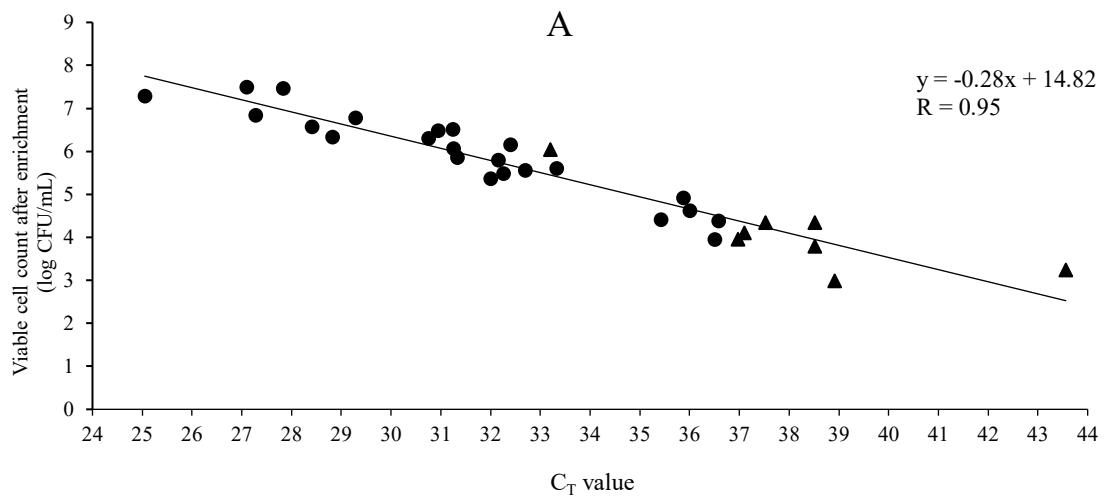


Figure 5. Distribution of after enrichment bacterial concentrations and C_T values of samples prepared from retail chicken liver (A) and breast fillets (B) inoculated with *C. jejuni* (ATCC 29428) suspension. Closed circles (●) and triangles (▲) represent samples prepared using the homogenization and wrap procedures, respectively.

The C_T values and viable cell counts after enrichment culture of chicken samples inoculated with the standard bacterial suspension sampled using the homogenization and wrap procedures are shown in Tables 1 (liver) and 2 (breast fillet).

2-3-3 Direct-qPCR 法による推定生菌数と培養法による生菌数の比較

培養法で測定、Direct-qPCR 法で推計した増菌前菌数 (Table 6, 7) の分布を箱ひげ図で Figure 6 に示した。Homogenization 処理でサンプリングした時、培養法の生菌数と Direct-qPCR 法で推計した生菌数に有意な差は無かったが (キモ : $p=0.68$ 、ササミ : $p=0.76$)、Wrap 処理を用いた場合、キモとササミの両方で有意差が認められた ($p<0.01$)。培養法で測定した生菌数と Direct-qPCR 法で推計した生菌数は、Homogenization 処理でサンプリングしたキモとササミで同程度だったが、Wrap 処理の場合は平均で $0.72\sim 1.10 \log \text{CFU/g}$ 低値だった。

Table 6. Viable cell counts obtained via the culture method and viable cell counts estimated by C_T values obtained via direct-qPCR for samples of liver inoculated with standard bacterial suspensions and sampled using the homogenization and wrap procedures. Only samples with detectable viable cell counts obtained via the culture method and C_T values obtained via the direct-qPCR method are shown

Batch	Dilution	Homogenization		Wrap
	rate ^a	(log CFU/g)		(log CFU/g)
	(times)	Culture	Direct-qPCR ^b	Direct-qPCR
a	50	4.31	3.97	4.25
a	500	3.52	3.75	3.02
b	50	4.31	4.03	3.60
b	500	3.68	NEG ^c	2.46
b	5000	2.95	NEG	2.17
c	50	4.09	3.81	3.66
c	500	3.26	3.81	2.55
d	500	3.60	3.24	2.46
d	5000	2.98	NEG	1.90
e	500	3.60	NEG	3.28
f	50	4.96	4.63	3.45
f	500	3.69	4.05	3.16
f	5000	2.85	NEG	2.44
Average ratio ^d		-	1.01	1.27

^a Dilution rate of inoculated standard bacterial solution.

^b Viable cell count estimated from C_T values.

^c Negative.

^d Average of viable cell count obtained from the culture method divided by viable cell count estimated from C_T values.

Table 7. Viable cell counts obtained via the culture method and viable cell counts estimated by C_T values obtained via direct-qPCR for samples of breast fillet inoculated with standard bacterial suspensions and sampled using the homogenization and wrap procedures. Only samples with detectable viable cell counts obtained via the culture method and C_T values obtained via the direct-qPCR method are shown

Batch	Dilution rate ^a (times)	Homogenization (log CFU/g)		Wrap (log CFU/g)
		Culture	Direct-qPCR ^b	Direct-qPCR
a	50	4.80	4.58	3.32
a	500	3.84	4.03	3.23
a	5000	2.99	3.32	2.40
b	50	4.28	4.64	3.44
b	500	3.48	3.96	3.20
b	5000	2.68	3.54	2.42
c	50	4.77	5.02	3.65
c	50	4.69	4.78	3.71
d	50	4.72	5.09	3.65
d	50	4.82	5.15	3.40
k	50	4.92	4.58	3.81
k	50	4.96	4.34	3.80
k	50	3.89	3.97	3.49
g	50	4.01	3.50	2.40
i	50	4.75	4.63	3.08
i	500	3.26	2.71	1.22
j	500	3.45	5.16	2.12
l	50	4.96	4.60	3.46
l	50	5.27	4.52	3.48
l	500	4.77	3.81	3.32
l	5000	3.01	3.23	2.67
Average ratio ^c		-	1.00	1.40

^a Dilution rate of inoculated standard bacterial solution.

^b Viable cell count estimated from C_T values.

^c Average of viable cell count obtained from the culture method divided by viable cell count estimated from C_T values.

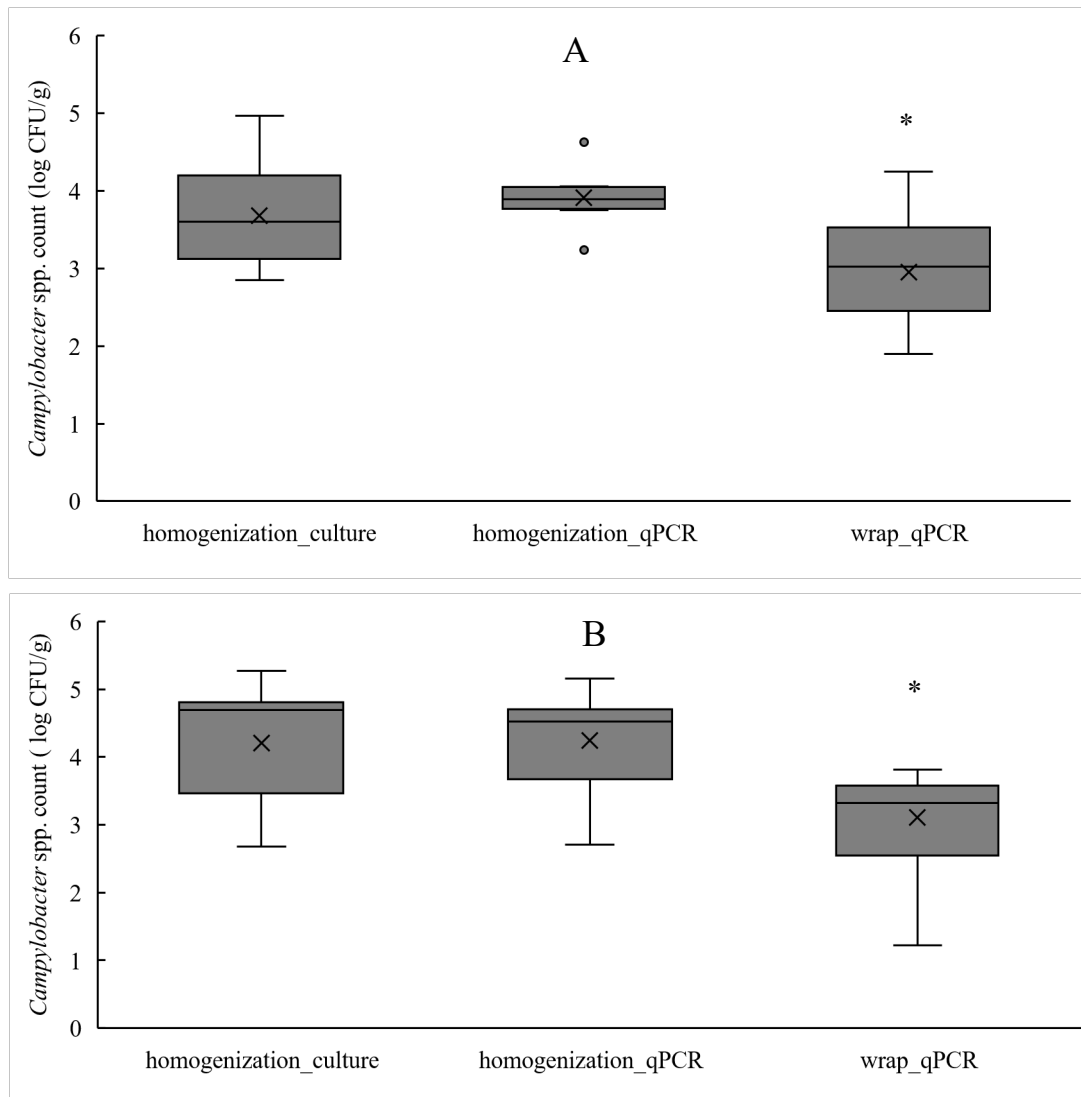


Figure 6. Distribution of *Campylobacter* spp. in sample using the homogenization and wrap procedures as determined using the culture and direct-qPCR methods. Samples were from livers (A) and breast fillets (B).

“Homogenization culture” indicates sampling using the homogenization procedure and viable cell count determined using the culture method.

“Homogenization qPCR” indicates sampling using the homogenization procedure and viable cell count determined using the direct-qPCR method.

“Wrap qPCR” indicates sampling using the wrap procedure and viable cell count determined using the direct-qPCR method.

The viable cell counts of sample using the homogenization and wrap procedures as determined using the culture and direct-qPCR methods are shown in Tables 6 (liver) and 7 (breast fillet).

* $p < 0.01$ compared with the homogenization culture method.

2-1-4 考察

増菌前と 16 時間増菌後の菌液濃度で作成した増菌検量線（回帰式）（Figure 4 A, B）の相関係数は高値（ $R=0.95, 0.91$ ）だった。増菌効率は試料の部位やサンプリング法で異なったが、Wrap 処理は増菌量がキモで平均 2.35、ササミで平均 0.91、Homogenization 処理より多く増菌した。Homogenization 処理でサンプリングするとキモとササミで増菌効率に差があったが、Wrap 処理ではこの差は小さかった。Homogenization 処理はストマッキング操作で試料を均一化するため、たんぱく質や脂質等の食品成分が混濁するが、Wrap 処理では食品成分の影響が少なく、増菌されやすかったと考えられた。また Wrap 処理が検出率、定量率ともに高値だった（Tables 1, 3）。

Andrew らは食品サンプルを増菌培養後、DNA 抽出して qPCR を行い、培養法と同等の検出率で *Campylobacter* 属菌を検出したと報告した（Sails ら, 2003）。私たちは Wrap 処理でサンプリングし、かつ PCR 反応阻害耐性を持つ試薬を用いて Direct-qPCR を行ったところ、キモ、ササミともに 100%の検出率で *Campylobacter* 属菌を検出した（Table 5）。

また増菌後生菌数（log CFU/mL）と C_T 値の間に高相関の回帰式が得られ、 C_T 値から 2 つの回帰式を経て、増菌前生菌数を推計することができた。Wrap 処理でサンプリングした試料の推計生菌数は、培養法で得られた生菌数より 0.72~1.10 log CFU/g 低値だった（Figures 6. A, B）。Wrap 処理は試料表面の *Campylobacter* 属菌を補足するサンプリング法であり、表面奥に存在する *Campylobacter* 属菌は捕らえられない。しかし検出率 100%であり、Wrap 処理を用いることで食品由来の PCR 反応阻害因子の影響を低減し、定量率を向上させることが可能である。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 ± 0.25 log CFU/g、 $p = 0.62$ 、ササミ： 0.52 ± 0.34 log CFU/g、 $p = 0.29$ ）（Tables 6, 7）。したがって、推計された生菌数に係数に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。このことから本方法は定量的汚染実態調査で活用されれば、リスクアセスメントに資することができると考えられた。

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ことから、1.00 log CFU/mL 未満の低菌量でも C_T 値は検出可能だと分かった。（Tables 1, 2）

第3章 市販鶏肉中の *Campylobacter* 属菌の定量的検出

3-1 目的

Campylobacter 食中毒において、その感染源を特定するのは困難なことが多い。その主な理由として、食品中の汚染菌量が比較的少ないこと、潜伏期間が比較的長い（2～7日間）ため原因食品が残っていないか、食品中の菌が死滅あるいは減少し、食品からの菌分離が困難であることなどが考えられる。感染源として特に注意が必要なのは鶏肉で、市販鶏肉の本菌の汚染率が他の畜肉に比べ高いことが報告されている（食品安全委員会, 2015）。養鶏場内に菌が持ち込まれると水平感染によって短期間に感染が広がり、鶏の消化管内から内容物1グラム当たり $10^5 \sim 10^9$ 個の菌が検出される（Berndtson, 1992）。このような保菌鶏が食鳥処理場に搬入されると、様々な処理工程で交差汚染が起こり（Corry, 2001、Son, 2007）、結果として市販鶏肉の汚染率は高くなる（Onoら, 1999、三澤ら, 2003）。

本章では、開発した Direct-qPCR 法を用いて小売店で販売している市販鶏肉中の *C. jejuni* を定量検出し、検出率や定量率を培養法による結果と比較した。

3-2 方法

3-2-1 培養法による市販鶏肉のサンプリング法、及び培養法による生菌数の測定

試料は 2019 年 6 月から 2022 年 9 月にかけて神戸市内の小売店で購入した市販鶏肉（キモ 30 検体、ササミ 24 検体）計 54 検体を用いた。市販鶏肉 25 g を Homogenization 処理と Wrap 処理（Figure 2 参照）でそれぞれサンプリングし、培養法（2-2-1 参照）で増菌前及び増菌後生菌数を測定した。

3-2-2 Direct-qPCR 法の手順

前述の培養法と並行して増菌培養後の試料菌液を Direct-qPCR 法（2-2-3 参照）で C_T 値を測定した。 C_T 値が得られた試料を *Campylobacter* 属菌陽性検体とした。 C_T 値は得られなかったが培養法で mCCDA 培地上に *Campylobacter* 属菌を疑うコロニーが生育した試料は、そのコロニーを API Campy（bioMérieux）で同定検査を実施した。

3-3 結果

3-3-1 市販鶏肉の *Campylobacter* 属菌検出及び定量

市販キモ、ササミの *Campylobacter* 属菌生菌数を Tables 8, 9 に、検出率及び定量率を Tables 10, 11 に示した。Direct-qPCR で C_T 値が検出された試料、または、確認試験で *Campylobacter* 属菌と同定された試料を真の陽性試料として、真の陽性率を算出した。また、培地上にコロニーが検出された試料のうち、遊走 (swarming) などにより、コロニーがカウントできなかった試料、およびコロニー数が 10 未満の試料を除いて、定量率を算出した。Wrap 処理でサンプリングした場合の検出率は、培養法及び Direct-qPCR 法で高かった (キモ : 100%, ササミ : 85.7%)。Homogenization 処理でサンプリングすると、培養法 (キモ : 95.7%、ササミ : 92.9%) は Wrap 処理と同等だったが、Direct-qPCR 法 (キモ : 30.4%、ササミ : 35.7%) で低値だった。Wrap 処理でサンプリングした定量率は、Direct-qPCR 法 (キモ : 100%、ササミ : 85.7%) で高値、培養法 (キモ : 13.0%、ササミ : 0%) で低値だった。Homogenization 処理でサンプリングした定量率は、Direct-qPCR 法 (キモ : 30.4%、ササミ : 35.7%)、培養法 (キモ : 4.3%、ササミ : 0%) でともに低値だった。 C_T 値から算出した生菌数の推計値 (log CFU/mL) は、Direct-qPCR 法でキモ及びササミを Wrap 処理でサンプリングした場合、それぞれ 0.37~3.14、0.64~3.17、Homogenization 処理ではそれぞれ 3.39~3.84、1.50~2.54 だった。キモ、ササミともに Wrap 処理でサンプリングしたとき Homogenization 処理より低菌量を測定できた。

培養法で定量できた試料がキモで 1 サンプルのみであったため、培養法による生菌数と Direct-qPCR 法による推計値の差については、評価できなかった。

Table 8. Number of viable cells before and after enrichment culture of retail liver samples using homogenization and wrap procedures and C_T values of the solutions after enrichment culture

Sample	Before enrichment (log CFU/mL)		After enrichment (log CFU/mL)		C _T value	
	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap
a	ND ^a	ND	NA ^b	2.77	NEG ^c	NEG
b	ND	ND	ND	4.09	NEG	36.97
c	NA	NA	3.85	TNTC ^d	NEG	30.86
d	NA	NA	5.58	TNTC	35.32	29.50
e	ND	ND	NA	3.28	NEG	NEG
f	<10 ^e	<10	TNTC	3.79	NEG	33.72
g	<10	ND	NA	4.57	NEG	37.56
h	NA	2.10	3.96	4.78	36.25	33.35
i	<10	<10	3.43	4.63	NEG	38.63
j	ND	ND	2.62	3.00	NEG	36.08
k	<10	<10	NA	TNTC	36.77	30.28
l	<10	ND	NA	NA	NEG	32.61
m	ND	ND	TNTC	NA	NEG	NEG
n	<10	ND	3.18	3.65	NEG	39.89
o	ND	<10	4.48	NA	NEG	35.50
p	ND	<10	<10	4.40	NEG	34.72
q	<10	<10	3.00	5.00	NEG	32.17
r	ND	ND	NA	4.51	NEG	31.89
s	<10	ND	TNTC	NA	NEG	36.25
t	ND	ND	NA	NA	NEG	37.70
u	2.67	1.78	4.84	NA	33.90	32.65
v	ND	ND	TNTC	2.18	NEG	NEG
w	ND	ND	ND	ND	NEG	NEG

x	ND	ND	TNTC	ND	NEG	NEG
y	>10	>10	NA	5.00	NEG	38.79
z	NA	NA	TNTC	TNTC	40.98	31.17
aa	NA	NA	2.32	NA	NEG	36.73
ab	>10	2.41	3.92	5.71	40.28	31.40
ac	ND	ND	>10	2.02	NEG	NEG
ad	NA	NA	NA	NA	38.38	28.93

^a Not detected.

^b Not available; colonies could be observed on the medium but could not be counted due to swarming.

^c Negative.

^d Too numerous to count.

^e The number of colonies was less than 10.

^f Not tested.

Table 9. Number of viable cells before and after enrichment culture of retail breast fillet samples using homogenization and wrap procedures and C_T values of the solutions after enrichment culture

Sample	Before enrichment (log CFU/mL)		After enrichment (log CFU/mL)		C _T value	
	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap
a	ND ^a	ND	NA ^b	NA	NEG ^c	40.45
b	ND	ND	ND	ND	NEG	NEG
c	ND	ND	ND	1.78	NEG	39.80
d	ND	ND	ND	ND	NEG	NEG
e	ND	ND	ND	NA	NEG	40.62
f	ND	ND	<10 ^d	2.19	NEG	38.06
g	ND	ND	<10	ND	42.71	NEG
h	ND	ND	3.34	3.29	41.37	41.16
i	ND	ND	2.54	2.85	42.50	30.65
j	ND	ND	4.20	4.12	37.53	35.26
k	ND	ND	NA	NA	NEG	44.29
l	ND	ND	NA	2.32	NEG	NEG
m	ND	ND	2.97	2.48	NEG	42.89
n	ND	ND	NA	3.53	NEG	42.99
o	ND	ND	3.33	NA	NEG	NEG
p	ND	ND	NA	ND	NEG	NEG
q	ND	ND	NA	3.15	NEG	42.41
r	ND	ND	ND	ND	NEG	NEG
s	ND	ND	ND	ND	NEG	NEG
t	ND	NA	NA	4.21	NEG	38.37
u	ND	ND	ND	ND	NEG	NEG
v	ND	ND	2.02	2.98	NEG	NEG
w	ND	ND	NA	ND	43.32	NEG
x	ND	ND	ND	ND	NEG	NEG

^a Not detected.

^b Not available; colonies could be observed on the medium but could not be counted due to swarming.

^c Negative.

^d The number of colonies was less than 10.

^e Not tested.

Table 10. Detection and quantification rates of retail chicken liver tested for *Campylobacter* spp. using the culture or direct-qPCR method

Sampling method	Culture method				Direct-qPCR method	
	Before enrichment		After enrichment		Homogenization	Wrap
	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap		
Sample	30	30	30	30	30	30
Countable	1	3	11	12	7	23
Uncountable	16	12	11	11	-	-
ND	13	15	8	7	23	7
True positive	23	23	23	23	23	23
True negative	7	7	7	7	7	7
True positive rate	-	-	95.7%	100%	30.4%	100%
Quantification rate	4.3%	13.0%	-	-	30.4%	100%

Countable: The number of samples where colonies could be counted using the culture method and C_T values could be detected using the direct-qPCR method.

Uncountable: The number of samples where colonies could not be counted due to swarming or other reasons, and the number of samples with fewer than 10 colonies.

ND: The number of samples where no colonies were detected.

True positive: The number of samples with C_T values detected via direct-qPCR or identified as *Campylobacter* spp. in the identification test.

True negative: The number of samples where no colonies were detected or wherein colonies were detected but not identified as *Campylobacter* spp. in the identification test.

True positive rate: (countable + uncountable) / true positive. Calculated using the results of the direct-qPCR method and after enrichment of the culture method.

Quantification rate: countable / true positive. Calculated using the results of the direct-qPCR method and before enrichment of the culture method.

The viable cell counts before and after enrichment culture of chicken samples inoculated with the standard bacterial suspension sampled using homogenization and wrap procedures are shown in Table 8.

Table 11. Detection and quantification rates of retail chicken breast fillet tested for *Campylobacter* spp. using the culture or direct-qPCR method

Sampling method	Culture method				Direct-qPCR method	
	Before enrichment		After enrichment		Homogenization	Wrap
	Homogenization	Wrap	Homogenization	Wrap		
Sample	24	24	24	24	24	24
Countable	0	0	4	9	5	12
Uncountable	0	1	9	3	-	-
ND	24	23	11	12	19	12
True positive	14	14	14	14	14	14
True negative	10	10	10	10	10	10
True positive rate	-	-	92.9%	85.7%	35.7%	85.7%
Quantification rate	0%	0%	-	-	35.7%	85.7%

Countable: The number of samples where colonies could be counted using the culture method and C_T values could be detected using the direct-qPCR method.

Uncountable: The number of samples where colonies could not be counted due to swarming or other reasons, and the number of samples with fewer than 10 colonies.

ND: The number of samples in which no colonies were detected.

True positive: The number of samples with C_T values detected via direct-qPCR or identified as *Campylobacter* spp. in the identification test.

True positive rate: (countable + uncountable) / true positive. Calculated using the results of the direct-qPCR method and after enrichment of the culture method.

Quantification rate: countable / true positive. Calculated using the results of the direct-qPCR method and before enrichment of the culture method.

The viable cell counts before and after enrichment culture of chicken samples inoculated with the standard bacterial suspension sampled using the homogenization and wrap procedures are shown in Table 9.

3-4 考察

市販鶏肉試料（キモ、ササミ）中の *Campylobacter* 属菌を Direct-qPCR 法で検出・定量したところ、Wrap 処理でサンプリングしたとき、キモで 100%、ササミで 85.7%の試料から *Campylobacter* 属菌が検出された（Tables 10, 11）。Homogenization 処理では、キモは 30.4%、ササミは 35.7%だった。Wrap 法は増菌に影響すると思われる食品成分等の混入が少なく、増菌効率の低下が起こりにくく、低菌量の *Campylobacter* 属菌でも確実に検出・定量できたと考える。一方、Homogenization 処理の検出率はキモ、ササミともに Wrap 処理より低値だった。これは、食品成分等が増菌を抑制したり、PCR 反応を阻害したことなどが要因と考えられる。Homogenization 処理だとキモ、ササミは同等の検出率だったが、Wrap 処理だとササミがキモより低い検出率だった。これは、ササミ表面の水分量がキモより少なかったため、Wrap 処理では *Campylobacter* 属菌が回収されにくかったためだと考えられた。培養法の定量率は、Wrap 処理では、キモで 100%、ササミで 85.7%だったが、Homogenization 処理では、キモで 4.3%、ササミで 0%だった（Tables 10, 11）。市販鶏肉は汚染菌数が少ないことから、培養法での検出が困難であり、食品中に含まれる増菌阻害物質が原因で定量率が低下すると考えられる（Willis, 1997）。

市販鶏肉試料から低菌量の *Campylobacter* 属菌を検出・定量するため、Wrap 処理で *Campylobacter* 属菌を採取し、増菌培養後、Direct-qPCR 法で検出・定量したところ、培養法より高率で *Campylobacter* 属菌を検出できた。Wrap 処理及び Direct-qPCR 法を用いることで *Campylobacter* 属菌が 1.00 log CFU/mL 程度汚染した鶏肉を定量可能である。今後、他の食品中又は環境中の *Campylobacter* 属菌を検出・定量する方法として活用が期待される。

第4章 調理モデル実験による *Campylobacter* 属菌の定量的検出

4-1 目的

Campylobacter 食中毒は低菌量の摂取で発症するとされ (Teunis ら, 2005)、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 (Callicott ら, 2008、日本食品衛生協会, 2018、Nauta ら, 2005、Yokoyama, 2017)。*Campylobacter* 食中毒予防対策として、調理時の交差汚染を低減することが有効とされており (長谷川, 2013)、これまでに汚染伝播率を測定する調理モデル実験が報告されてきた (Yao ら, 2021、Verhoeff-Bakkenes, 2008)。しかしこれら先行研究によると、汚染鶏ムネ肉から手への汚染伝播率は2.7~23.9%、汚染した手から調理済みパンへの汚染伝播率は0.8~9.5%と、調理モデルによって汚染伝播率にばらつきがみられる。調理工程、調理環境は多様なので、汚染伝播率を解明するには伝播汚染する事象をモデル化し、頻回に実験を繰り返し行いデータを蓄積することが必要となる。

私たちは低菌量の *C. jejuni* を定量するため、増菌培養後の菌液を食品夾雑物中の PCR インヒビターに影響されない PCR 反応試薬を用いて qPCR (Direct-qPCR 法) を行い PCR 検量線 (C_T 値回帰式) に加え、増菌培養後の生菌数から増菌培養前の生菌数に回帰する増菌回帰式を用いて増菌前の菌数を推計する方法を開発した (伊藤ら, 2019、第2章)。増菌培養することで、食品夾雑物や死菌の影響を少なくできること、かつ DNA 抽出操作を不要としたことが特徴である。

本章では調理モデル実験を行い、Direct-qPCR 法を用いて *C. jejuni* 菌数を計測し、汚染伝播率を明らかにした。さらに除菌・殺菌モデル実験を行って、*C. jejuni* が低減する現象を見える化した。

4-2 方法

4-2-1 試料と *C.jejuni* 汚染試料の調製

C. jejuni (ATCC 29428) をプレストン培地で 37°C、24 時間増菌培養し、これを標準菌液とした。この標準菌液 (6.0~7.0 log CFU/mL) を後述する鶏肉試料やトレーの汚染に用いた。

冷凍 (-20°C) 保存した市販の鶏肉試料 (ササミ : 60~80 g) を緩慢解凍後、標準菌液に 1 分間浸漬し、10 分間ステンレス網の上に静置した試料を *C. jejuni* 汚染ササミとしてモデル実験に供した。この時、標準菌液浸漬前と網上で静置後に重量測定し、その差を標準菌液付着量 (mL) とした。

4-2-2 三次汚染調理モデル (model 1)

C. jejuni 汚染ササミを下処理 (筋取り:ササミの筋の両側に沿うように切込みを入れ、ササミを裏返す。包丁で筋のすぐ上に切込みを入れ、包丁の背で筋を抑えてしごきながら、筋と身をはがす) し、使用した調理器具類 (まな板、包丁、手袋) に *C. jejuni* を汚染させた (以下、二次汚染)。これらの器具を用いて、生、または茹でたほうれんそう (65~75 g) を四切、またはきゅうり (100~110 g) を輪切 (厚さ 2~3 mm)、千切 (斜め 2 mm 程度に薄切り後、縦 2 mm に細切り)、乱切 (斜めに 20 mm 程度切った後、90°C回転させて切る) して *C. jejuni* を汚染させた (以下、三次汚染)。各食品に伝播した *C. jejuni* 菌量は、試料液 (後述) を 37°C で 16 時間培養後、Direct-qPCR 法で計測した (Figure 7)。モデル実験は 9~14 回行い、三次汚染率 (三次汚染菌数/一次汚染菌数×100) と汚染発生率 (三次汚染検出回数/実験回数×100) を算出した。*C. jejuni* 汚染ササミの生菌数 (一次汚染菌数) は、標準菌液の付着量 (mL) に標準菌液濃度 (log CFU/mL) を乗じて算出した。

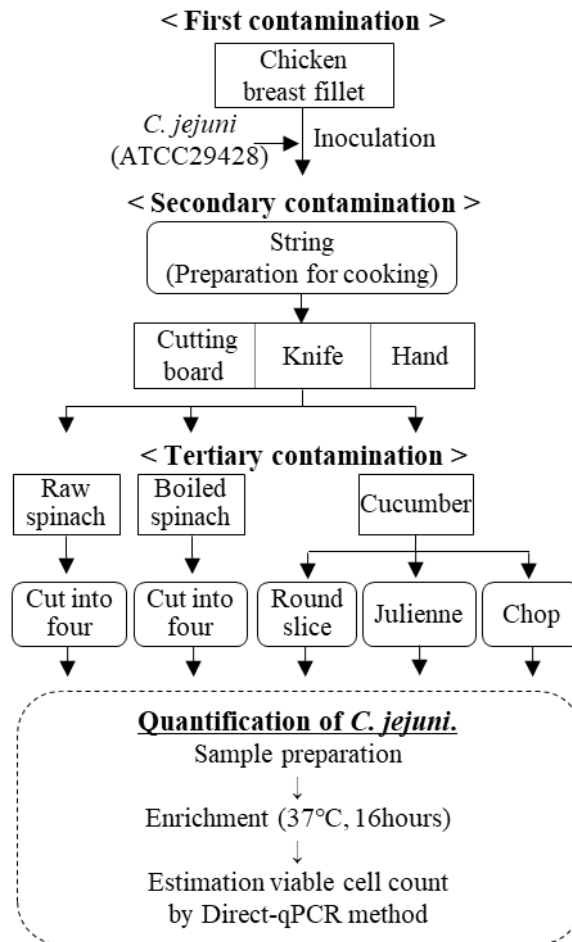


Figure 7. Procedure for tertiary contamination cooking model.

4-2-3 除菌・殺菌モデル (model 2)

100 倍希釈した標準菌液 (4.0~6.0 log CFU/mL) 1 mL をトレー (ステンレス 150×200 mm) に滴下した後、以下のモデル実験を行った (Figure 8)。

(a)ふきん (不織布 150×150 mm、東和産業) を直角に 4 つ折りして、面を変えて 2 回拭き取る

(b)殺菌剤 (消毒用エタノール 76.9~81.4 vol%、富士フィルムワコーケミカル) 2 mL を噴霧し 1 分間静置後、(a)と同様にふきんで拭き取る

(c)殺菌剤 (酸性電解水 有効塩素濃度 30~40 ppm) 2 mL を噴霧し 1 分間静置後、(a)と同様にふきんで拭き取る

(d)ペーパータオル (パルプ 218 × 230 mm、日本製紙クレシア) を直角に 4 つ折りし、標準菌液を吸取後、殺菌剤 (エタノール) 2 mL を噴霧し 1 分間静置後、(a)と同様にふきんで拭き取る

(e)ペーパータオルを直角に 4 つ折りし、標準菌液を吸取後、殺菌剤 (酸性電解水) 2 mL を噴霧し 1 分間静置後、(a)と同様にふきんで拭き取る

(a)~(e)のモデル実験で使用したふきんはいずれも乾燥した状態のものと PBS 2 mL で湿らせた状態のものを使用した。トレー、ふきんに生残した *C. jejuni* 菌量は、試料液 (後述) を 37°C, 16 時間培養後、Direct-qPCR 法で計測した。(a)~(e)のモデル実験は 8~12 回行い、拭き取り後にトレーまたはふきんに生残した *C. jejuni* の割合 (生残率) と生残発生率 ($C. jejuni$ 生残検出回数 / 実験回数 × 100) を算出した。

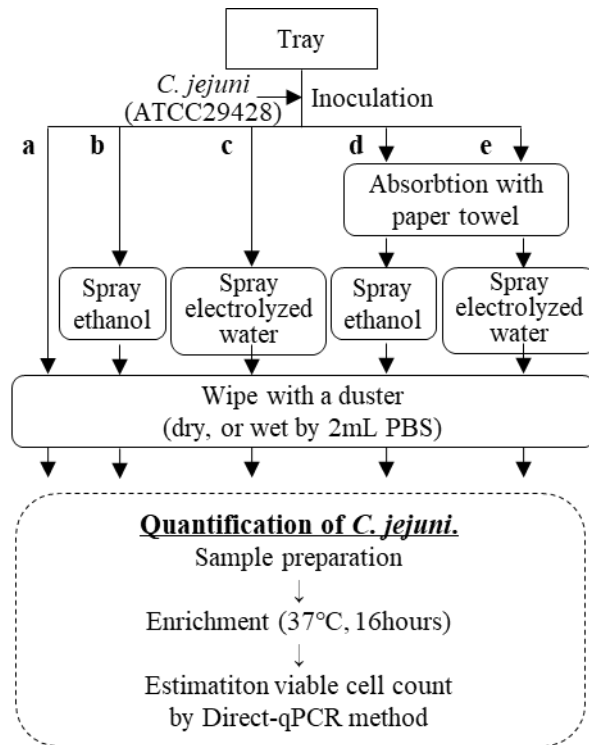


Figure 8. Procedure for sanitization and disinfection model.

4-2-4 三次汚染調理モデルにおける *C. jejuni* の定量

1) 試料調製と培養法による菌数測定

ほうれんそう及びきゅうりに三次汚染した *C. jejuni* の菌数測定は ISO/TS 10272-2 に準じて行った。試料 25 g にプレストン培地 100 mL を加え、ストマッカー (E-Mix primo, AS ONE) で均一化し、試料液とした (Homogenization 処理)。2-2-1 に示した培養法を用いて、試料液の増菌前生菌数と増菌後生菌数と測定した。

2) Direct-qPCR 法による C_T 値測定

2-2-3 に示した Direct-qPCR 法で C_T 値を測定した。モデル実験を頻回実施するため、プライマー・プローブには試薬単価が安価で特異性の高い TaqMan[®]MGB 遺伝子発現キット (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で、*C. jejuni* の特異遺伝子である *ccoN* の増幅配列 (Toplak ら, 2012) を含んだものを用いた。PCR mixture には、増菌後試料菌液 1 μ L と premix 14 μ L (DNA Polymerase 0.56 μ L, PCR Buffer 7.5 μ L, 1.5 mM MgCl₂ 0.75 μ L, TaqMan[®]MGB Probe 1.4 μ L, Primer Forward/Reverse 0.6 μ L) を混合した。

3) 増菌回帰式

モデル実験とは別に、三次汚染調理モデル操作し Homogenization 処理で試料調製後、培養法で菌数測定した。得られた増菌培養前生菌数と増菌培養後生菌数で検量線、及び増菌回帰式を作成した。

4) C_T 値回帰式

3)の増菌培養後の菌液を Direct-qPCR に供し、 C_T 値を測定した。検出された C_T 値と増菌培養後生菌数で、検量線及び C_T 値回帰式を作成した。

4-2-5 除菌・殺菌モデルにおける *C. jejuni* の定量

1) 試料の調製と培養法による菌数測定

拭き取り後のふきんをプチットカンピロに入れ、1 分間チューブを揉み均一化し、試料液とした。トレー表面に生残した *C. jejuni* は Pro-media ST-25 PBS (エルメックス) で回収し、綿球先端をプチットカンピロに入れ、同様に均一化し、試料液とした (swab 処理)。2-2-1 に示した培養法を用いて、試料液の増菌前生菌数と増菌後生菌数と測定した。

2) 増菌回帰式

4-2-4 3)と同様に除菌・殺菌モデル実験後、拭き取り法で調製した試料の増菌培養前生菌

数と増菌培養後生菌数で検量線及び、増菌回帰式を作成した。

3) C_T 値回帰式

4-2-4)と同様の方法で、増菌培養後の菌液 1 μ L を Direct-qPCR に供し、 C_T 値と増菌培養後生菌数で検量線及び C_T 値回帰式を作成した。

4-2-6 推計された増菌培養前生菌数の妥当性

増菌回帰式及び C_T 値回帰式から推計された増菌培養前生菌数が、培養法で計測した増菌培養前生菌数と同等か評価するため、箱ひげ図を作成した。

4-2-7 統計解析

増菌回帰式と C_T 値回帰式は SPSS ソフトウェア (IBM) を用いて、相関係数を解析した。T-test 及び箱ひげ図の作成も同ソフトウェアで行った。

4-3 結果

4-3-1 C_T 値から推計された増菌培養前生菌数の評価

培養法で測定した増菌前生菌数と増菌後生菌数で作成した増菌回帰式、Direct-qPCR 法で測定した C_T 値と増菌後生菌数で作成した C_T 値回帰式を Figure 9(三次汚染調理モデル(model 1))、Figure 10(除菌・殺菌モデル(model 2))に示した。両モデルとも高い相関が認められた。ただし、増菌培養前生菌数が少なく、試料液 0.1 mL 中の *C. jejuni* 菌数(コロニー数)が 10 CFU 未満のデータは回帰式作成には用いていない(ISO 7218, 2007)。2つの回帰式を用いて推計した増菌培養前生菌数と培養法で測定した生菌数を比較したところ、三次汚染調理モデルでは、培養法は平均 $2.61 \pm 0.70 \log$ CFU/mL、Direct-qPCR 法は平均 $2.61 \pm 0.48 \log$ CFU/mL で有意な差は無かった ($p=0.99$) (Figure 11)。除菌・殺菌モデルでは、培養法は平均 $3.07 \pm 0.64 \log$ CFU/mL、Direct-qPCR 法は平均 $3.08 \pm 0.49 \log$ CFU/mL で有意な差は無かった ($p=0.99$) (Figure 12)。両モデルともに Direct-qPCR 法から推計される増菌培養前生菌数は培養法と同等だった。

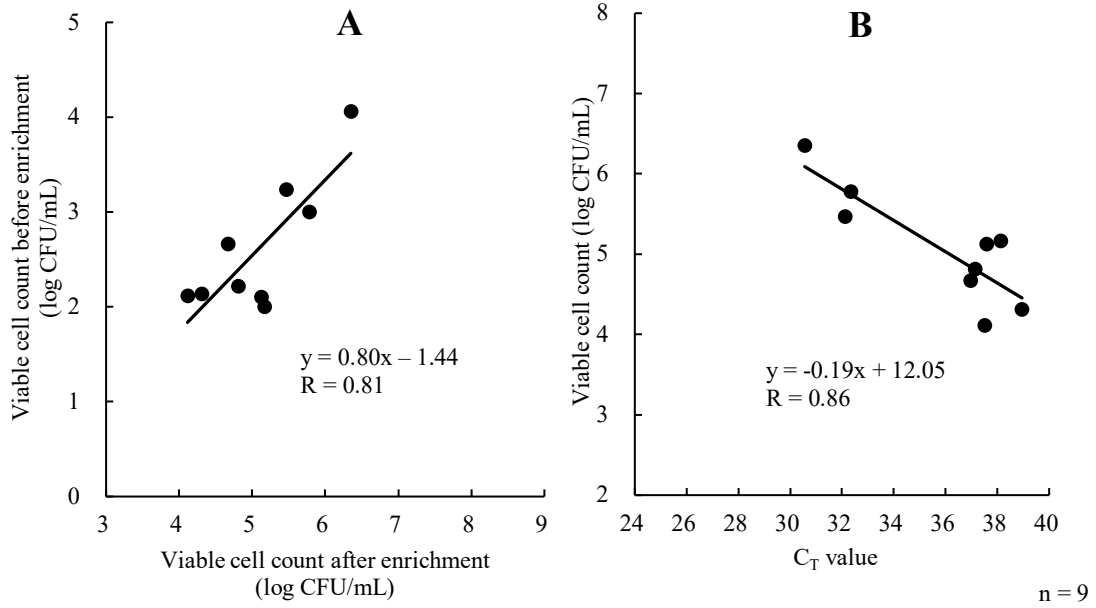


Figure 9. Distribution of viable cell counts before and after enrichment culture and distribution of viable cell counts and C_T values after enrichment culture chicken samples inoculated with *C. jejuni* (ATCC 29428) suspension sampled by the homogenization procedure.

“A” indicates the distribution of viable cell counts before and after enrichment culture.

“B” indicates the distribution of viable cell counts and C_T values after enrichment culture.

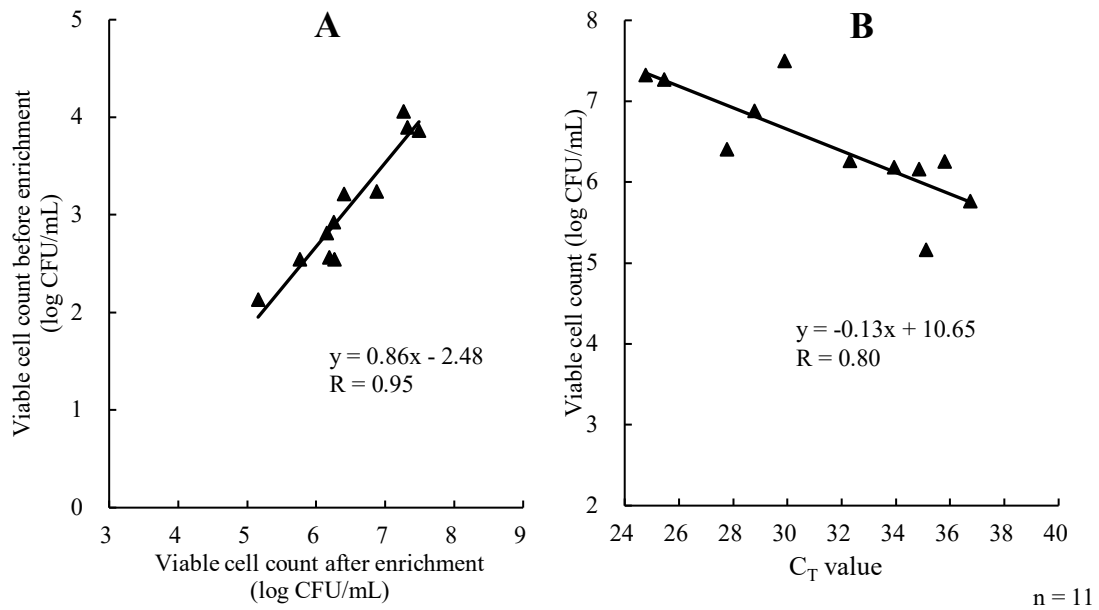


Figure 10. Distribution of viable cell counts before and after enrichment culture and distribution of viable cell counts and C_T values after enrichment culture trays inoculated with *C. jejuni* (ATCC 29428) suspension sampled by the swab method.

“A” indicates the distribution of viable cell counts before and after enrichment culture.

“B” indicates the distribution of viable cell counts and C_T values after enrichment culture.

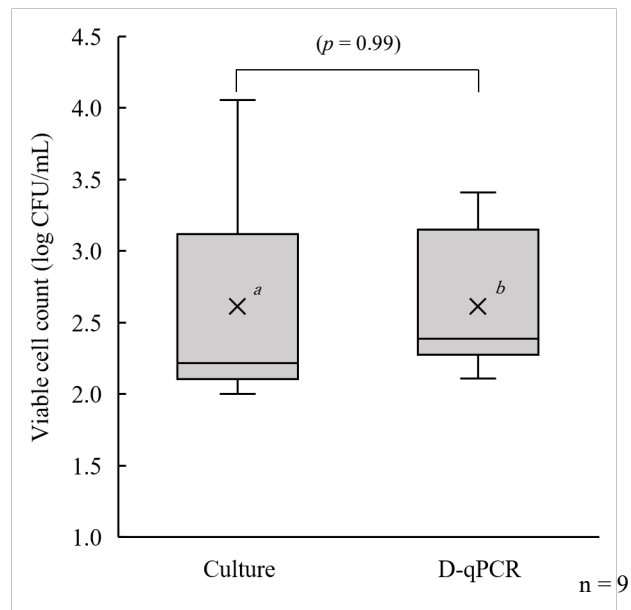


Figure 11. Box-and-whisker diagram of *C. jejuni* counts determined by the culture or the direct-qPCR method in a tertiary contamination cooking model.

^a Culture method average: 2.61 ± 0.70 log CFU/mL

^b D-qPCR method average: 2.61 ± 0.48 log CFU/mL

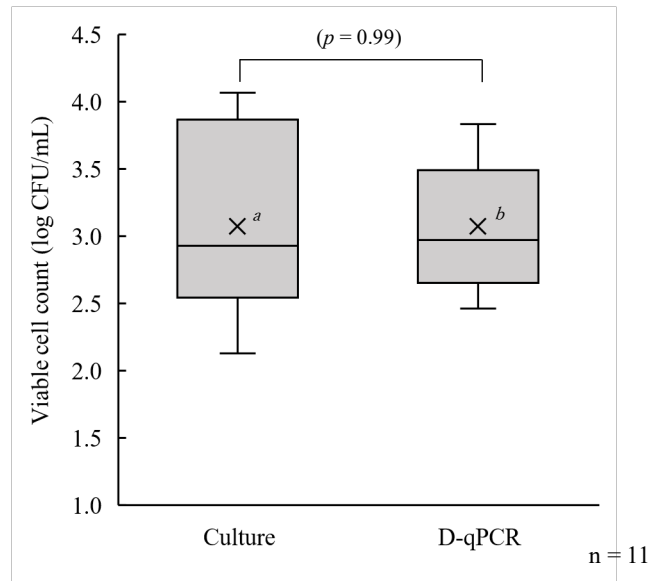


Figure 12. Box-and-whisker diagram of *C. jejuni* counts determined by the culture or the direct-qPCR method in the sanitization and disinfection model.

^a Culture method average: 3.07 ± 0.64 log CFU/mL

^b D-qPCR method average: 3.08 ± 0.49 log CFU/mL

4-3-2 三次汚染調理モデル (model 1)

ほうれんそう (Table 10) はまな板から 5.38% (茹で)、3.07% (生) の *C. jejuni* が三次汚染し、包丁から 1.10% (茹で)、0.43% (生)、手から 1.21% (茹で)、1.01% (生) 伝播した。三次汚染率を積算すると、一次汚染した *C. jejuni* の 7.69%が茹でたほうれんそうに汚染し、4.51%が生ほうれんそうに汚染した (Figure 13)。ほうれんそうを四切する場合、茹での方が生より高率で *C. jejuni* が三次汚染した。汚染発生率は、まな板が 92.9% (茹で)、100% (生) で高かった。

きゅうり (Table 11) の三次汚染率は、まな板から 3.92~5.18%、包丁から 0.80~1.69%、手から 1.46~2.23%とまな板が高かった。きゅうりの千切でまな板からの三次汚染率が 5.18%と高かったが、包丁からは 0.80%と低かった。三次汚染率を積算したところ、きゅうりを千切したとき、一次汚染した *C. jejuni* の 8.21%がきゅうりに汚染し、乱切で 7.67%、輪切で 6.58%だった (Figure 13)。汚染発生率では、まな板で 90%以上、千切したときに包丁から伝播する確率が最も低く 45.5%だった。

Table 10. Model 1 (Spinach): Viable cell count of *C. jejuni*, contamination rate, and contamination occurrence rate in spinach after the tertiary cooking model experiment

First ^a (log CFU ± SD)	Contamination phase		Tertiary ^b (log CFU ± SD)	Contamination rate ^c (%)	Occurrence rate ^d (%)
	Material	Boiled/Raw			
6.62 ± 0.41	Cutting board	Boiled	5.20 ± 0.31	5.38	92.9 (13/14)
6.29 ± 0.22	Cutting board	Raw	4.66 ± 0.41	3.07	100 (10/10)
6.69 ± 0.47	Knife	Boiled	4.46 ± 0.33	1.10	75.0 (9/12)
6.32 ± 0.24	Knife	Raw	3.76 ± 0.36	0.43	77.8 (7/ 9)
6.46 ± 0.23	Hand	Boiled	4.41 ± 0.40	1.21	80.0 (8/10)
6.36 ± 0.27	Hand	Raw	4.24 ± 0.41	1.01	70.0 (7/10)

^a Average viable cell count of *C. jejuni* contaminating breast fillet. (n = 7-13)

^b Average viable cell count of *C. jejuni* contaminated with spinach after model experiment. (n = 7-13)

^c Average contamination rate of each model experiment. The contamination rate was calculated using the following formula. “Viable cell count of sample after model experiments / viable cell count of first contamination *100 (%)”

^d Number of model experiments in which C_T values were detected / number of all model experiments *100 (%).

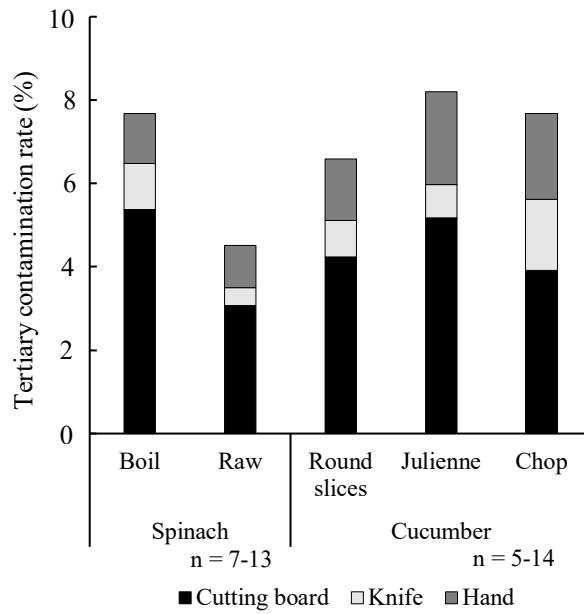


Figure 13. Model 1 total tertiary contamination rate by food sample and preparation method.

The bars showed the sum of the tertiary contamination rates of the samples.

Table 11. Model 1 (Cucumber): Viable cell count of *C. jejuni*, contamination rate, and contamination occurrence rate in cucumber after the tertiary cooking model experiment

First ^a (log CFU ± SD)	Contamination phase		Tertiary ^c (log CFU ± SD)	Contamination rate ^d (%)	Occurrence rate ^e (%)
	Material	way of cutting ^b			
6.72 ± 0.34	Cutting board	Round	4.88 ± 0.85	4.24	100(9/ 9)
6.44 ± 0.41	Cutting board	Julienne	5.03 ± 0.35	5.18	100(14/14)
6.51 ± 0.39	Cutting board	Chop	5.03 ± 0.51	3.92	90.0(9/10)
6.73 ± 0.27	Knife	Round	4.46 ± 0.55	0.88	77.8(7/ 9)
6.56 ± 0.29	Knife	Julienne	4.21 ± 0.39	0.80	45.5(5/11)
6.69 ± 0.39	Knife	Chop	4.62 ± 0.43	1.69	70.0(7/10)
6.72 ± 0.34	Hand	Round	4.54 ± 0.52	1.46	100(9/ 9)
6.43 ± 0.34	Hand	Julienne	4.54 ± 0.52	2.23	63.6(7/11)
6.65 ± 0.31	Hand	Chop	4.58 ± 0.35	2.06	70.0(7/10)

^a Average viable cell count of *C. jejuni* contaminating breast fillet. (n=5-14)

^b The way to cut cucumbers.

^c Average viable cell count of *C. jejuni* contaminated with cucumber after model experiment. (n=5-14)

^d Average contamination rate of each model experiment. The contamination rate was calculated using the following formula. “Viable cell count of sample after model experiments / viable cell count of first contamination *100 (%)”.

^e Number of model experiments in which C_T values were detected / number of all model experiments *100 (%).

4-3-3 除菌・殺菌モデル (model 2)

ふきん (Table 12) の生残率は、(a)ふきんで拭取後では 2.497%、2.942%、(b)エタノール噴霧して拭取後では 1.485%、1.551%、その他(c)、(d)、(e)で 0.002~0.085%だった。エタノールや酸性電解水処理により、ふきんの生残率は減少したが 0%にはならなかった。汚染菌液を吸い取らなかったとき ((a)~(c))、すべてのふきんに *C. jejuni* が生残した。一方、菌液を吸い取った後、殺菌剤を噴霧したときは ((d)、(e))、14.3~57.1%のふきんに *C. jejuni* が生残した。

トレイ (Table 13) の生残は、(a)ふきんで拭取後、(b)エタノール噴霧して拭取後、(c)酸性電解水噴霧して拭取後で確認されたが (生残率 0.001~0.034%)、ペーパータオルで吸い取る操作を加えると ((d)、(e)) *C. jejuni* は検出されなかった。また、酸性電解水で殺菌した時 ((c)) トレイに生残した菌数は少なくなる傾向がみられた。

また、拭き取りに用いたふきんの湿乾によって、生残率に差は無かった (Tables 12, 13)。

Table 12. Model 2 (Duster): Viable cell count of *C. jejuni*, survival rate, and contamination occurrence rate in duster after the sanitation and disinfection model experiment

Model	Contaminated <i>C. jejuni</i> ^a (log CFU±SD)	Procedure for sanitation and disinfection model			Viable cell count ^b (log CFU±SD)	Survival rate ^c (%)	Occurrence rate ^d (%)
		Step1	Step2	Step3			
(a)	5.19 ± 0.92	→	→	Wipe dry duster	2.90 ± 0.60	2.942	100(12/12)
	5.45 ± 0.92			Wipe wet duster	2.96 ± 0.64	2.497	100(11/11)
(b)	5.28 ± 0.92	→	Spray ethanol	Wipe dry duster	2.25 ± 0.49	1.551	100(10/10)
	5.28 ± 0.92			Wipe wet duster	2.21 ± 0.46	1.485	100(10/10)
(c)	6.02 ± 0.30	→	Spray electrolyzed water	Wipe dry duster	2.64 ± 0.31	0.058	100(9/ 9)
	6.02 ± 0.30			Wipe wet duster	2.56 ± 0.22	0.041	100(8/ 8)
(d)	5.64 ± 0.99	Absorb with paper towel	Spray ethanol	Wipe dry duster	1.58 ± 0.19	0.085	40.0(4/10)
	6.04 ± 0.34			Wipe wet duster	1.61 ± 0.34	0.004	40.0(4/10)
(e)	6.09 ± 0.38	Absorb with paper towel	Spray electrolyzed water	Wipe dry duster	1.70 ± 0.36	0.004	57.1(4/ 7)
	6.06 ± 0.00			Wipe wet duster	1.31 ± 0.00	0.002	14.3(1/ 7)

^a Average viable cell count of contaminant *C. jejuni* on tray. (n=1-11)

^b Average viable cell count of *C. jejuni* in duster after model experiment. (n=1-11)

^c Average survival rate of each model experiment. The survival rate was calculated using the following formula. “Viable cell count of sample after model experiments / viable cell count of first contamination *100 (%)”.

^d Number of model experiments in which C_T values were detected / number of all model experiments *100 (%).

Table 13. Model 2 (Tray): Viable cell count of *C. jejuni*, survival rate, and occurrence rate on tray after the sanitation and disinfection model experiment

Model	Contaminated <i>C. jejuni</i> ^a (log CFU±SD)	Procedure for sanitation and disinfection model			Viable cell count ^b (log CFU±SD)	Survival rate ^c (%)	Occurrence rate ^d (%)
		Step1	Step2	Step3			
(a)	4.77 ± 2.23	→	→	Wipe dry duster	1.72 ± 0.29	0.034	45.5(5/11)
	6.15 ± 0.20			Wipe wet duster	2.07 ± 0.25	0.009	33.3(4/12)
(b)	5.68 ± 0.92	→	Spray ethanol	Wipe dry duster	2.38 ± 0.75	0.003	30.0(3/10)
	5.63 ± 0.88			Wipe wet duster	1.77 ± 0.23	0.006	50.0(5/10)
(c)	6.03 ± 0.30	→	Spray electrolyzed water	Wipe dry duster	1.70 ± 0.43	0.010	55.6(5/ 9)
	6.23 ± 0.00			Wipe wet duster	1.23 ± 0.00	0.001	12.5(1/ 8)
(d)	N/A ^e	Absorb with paper towel	Spray ethanol	Wipe dry duster	ND ^f	0	0 (0/10)
	N/A			Wipe wet duster	ND	0	0 (0/10)
(e)	N/A	Absorb with paper towel	Spray electrolyzed water	Wipe dry duster	ND	0	0 (0/ 7)
	N/A			Wipe wet duster	ND	0	0 (0/ 7)

^a Average viable cell count of contaminant *C. jejuni* on tray. (n=1-5)

^b Average viable cell count of *C. jejuni* on trays after model experiment.

^c Average survival rate of each model experiment. The survival rate was calculated using the following formula. “Viable cell count of sample after model experiments / viable cell count of first contamination *100 (%)”.

^d Number of model experiments in which C_T values were detected / number of all model experiments *100 (%).

^e Not applicable.

^f Not detected.

4-4 考察

C. jejuni を含む試料を 16 時間増菌培養する前・後の菌液濃度から、高い相関の増菌回帰式を得た。増菌効率が高かったのは、拭き取り法で試料調製した除菌・殺菌モデルで (Figure 10)、Homogenization 法で調製した三次汚染調理モデルでは低かった (Figure 9)。これは三次汚染調理モデルでは、植菌した細菌が損傷または死滅すること、試料中の夾雑物が増菌効率に影響するためと考えられた。

C_T 検量線は高い相関の C_T 値回帰式 (Figures 9 B, 10 B) が得られたが、モデル間で回帰式の傾きが異なった。これは三次汚染調理モデルで食品から回収された *C. jejuni* 菌量が少なく、増菌培養を行っても菌数が 4~6 log CFU/mL にとどまり、データに偏りがあったことが要因である。

培養法で計測した生菌数と Direct-qPCR 法で推計した生菌数を比較したところ (Figures 11, 12)、三次汚染調理モデルでは培養法、Direct-qPCR 法ともに中央値が平均値より低値に、除菌・殺菌モデルでは中央値は平均値に近い値となった。両モデルともに培養法の生菌数と Direct-qPCR 法の推計値の分布は類似しており、有意差がなく Direct-qPCR 法で、低菌量でも汚染した菌量や生残した菌量が推計できると考えられた。

三次汚染調理モデルで三次汚染率を求めたところ、まな板からきゅうりに 3.92~5.18%、包丁からきゅうりに 0.80~1.69%、手からきゅうりに 1.46~2.23%の *C. jejuni* が三次汚染した (Table 11)。*C. jejuni* の三次汚染率については、Yao らまな板からきゅうりに 1.20~1.80%、包丁からきゅうりに 4.80~6.80% (Yao, 2021)、Verhoeff-Bakkenes らまな板からチキンフルーツサラダに平均 0.08%、手からチキンフルーツサラダに平均 0.16%伝播すると報告したが (Verhoeff-Bakkenes, 2008)、調理モデル及び試料、定量法などが異なるため比較は難しい。調理段階のリスクアセスメントで必要なのは、同じ測定法でモデル実験を繰り返し行い、どの手順のリスクが高いのかを明確にすることである。Direct-qPCR 法は迅速・簡便にモデル実験を繰り返し行うことが可能で、リスクアセスメントに適した測定法である。また食中毒発生事例のシミュレーション実験に活用することで、食中毒の原因食品や伝播経路の調査にも適用できる。

ほうれんそうへの三次汚染率は、茹でが生より高値だった (Figure 13)。茹でることではほうれんそうの水分量が増え、二次汚染源との接触面積が増加するとともに、水の表面張力に

より *C. jejuni* が伝播しやすい条件だったと考えられる。

きゅうりでは輪切及び乱切より、千切したときに三次汚染率が高かった (Figure 13)。千切はきゅうりとの接触面積が大きいことが要因と思われる。汚染発生率は、きゅうりを千切したとき包丁から 45.5%、まな板からは 100%だった。これは千切したとき、包丁ときゅうりの接触面積は小さいが、千切した後のきゅうりはまな板と接触する面積が大きいことが影響したと考えられる。汚染発生率は三次汚染率と同様に接触面積や接触時間が大きいと高くなることが示唆された。

除菌・殺菌モデルにおいて、汚染菌液を拭き取ったふきんの *C. jejuni* 生残率は最大 2.942% と低率だったが、モデル操作による細菌の損傷や死滅、ふきんから検出される *C. jejuni* 数に定量上限があったことが原因と考えられた。汚染菌液を吸い取った後、殺菌剤を噴霧するとトレーに *C. jejuni* は生残していなかった (Table 13)。しかし、拭き取ったふきんには *C. jejuni* が 1.5 log CFU 程度生残しており (Table 12)、ふきんが汚染源となるリスクがあること、ふきんの取り扱いに注意することを裏付けるデータが得られた。

第5章 総合考察

食品由来感染症の予防対策を講じる上で、リスクアセスメントは重要である。リスクアセスメントでは、食品汚染微生物の定量的評価が必要となる。しかし低菌量で感染する *Campylobacter* 食中毒のリスクプロファイルにおいては、食品や調理作業中の伝播菌量の定量データが少ないことが問題である。

Campylobacter 属菌の定量試験には、主に培養法 (direct plate counting method) や MPN 法 (most-probable-number method)、qPCR 法が用いられている。培養法や MPN 法は信頼できる値が推計できるとして、広く用いられている。しかし、それらの方法では、陰性の結果を得るのに 5~6 日間、さらに菌種の同定までには 10 日間かかる。これらのことから qPCR 法は迅速、高感度、特異性の点から他の方法より有利である。本研究では qPCR 法で課題とされていた死菌の影響を増菌培養することで小さくし、感度向上や食品中の PCR 反応阻害物質の除去のために行う DNA 抽出工程を省略した。加えて、食品成分に含まれる増菌培養及び PCR 反応阻害因子の影響を少なくする新しいサンプリング法を開発するとともに、PCR 反応阻害耐性を持つ酵素を使用し、迅速に低菌量の *Campylobacter* 属菌を検出・定量する一連手法を開発し、リスクアセスメントに必要な継続的な定量的評価を目指した。

食品成分が増菌培養や PCR 反応に影響を及ぼすことが考えられたので、食品試料をシートで包む Wrap 処理で *Campylobacter* 属菌をサンプリングし、増菌培養前後の生菌数を測定した。Wrap 処理は食品表面のみの回収であるため従来の Homogenization 処理より増菌前生菌数は少なかったが、増菌後生菌数は Wrap 処理の方が Homogenization 処理より多かった。これは Wrap 処理により食品中の増菌阻害物質が混入されにくくなり、増菌効率が向上したことを現している (伊藤ら, 2019)。また、キモに含まれる Fe は細菌の DNA を損傷し増菌阻害する (村田ら, 2008) など、キモは増菌阻害成分を多く含むが、Wrap 処理ではササミと同等の増菌効率になった。このように Wrap 処理を用いることで、鶏肉の部位による増菌効率の差を少なくできることが分かった。しかも、 C_T 値検出率は Wrap 処理が Homogenization 処理より高かった。増菌効率が高いことに加え、食品成分による PCR 反応阻害を少なくできたためと考えられた。しかし、Wrap 処理は内部の *Campylobacter* 属菌を補足しにくい。しかし、係数を乗じることで Homogenization 処理と培養法で計測した値と同等となることが

わかった。このように Wrap 処理と Direct-qPCR 法を組み合わせることで、従来の培養法と同等の検出定量ができることが分かった。本法は簡便かつ短時間で検出定量できることからリスクアセスメントに資するデータを提供できる。とりわけ操作が複雑かつ多様な調理段階において、開発した本法を活用することでモデル実験を頻回実施して定量データを得ることが可能となり、リスクアセスメントに必要なベースラインデータを構築できる。

市販鶏肉中の *Campylobacter* 属菌を Wrap 処理と Direct-qPCR 法の組み合わせで、高い定量率で検出することができた。市販鶏肉は汚染菌数が少ないことから培養法での検出が困難なことが多く、増菌培養でも食品中に含まれる増菌阻害物質等により検出率が低くなる。培養法でコロニー数が 10 個未満や未検出の場合でも、Direct-qPCR 法で C_T 値を検出することで生菌数を推計することができた。市販鶏肉の汚染実態調査を Direct-qPCR 法で行うことで、これまでよりも低菌量の汚染実態を把握できる。この調査を継続的に行い、ベースラインデータを構築、リスクアセスメントに活用することで、汚染リスクが高い時期や鶏肉部位などを評価できる。このように低菌量で発症する *Campylobacter* 属菌食中毒の予防対策を講じる上で、 $1.00 \log \text{CFU/mL}$ 程度の *Campylobacter* 属菌を検出できる本法は有用である。

三次汚染調理モデル実験により、三次汚染率が最も高かったのはまな板であり、汚染発生率も高かった。鶏生肉などを扱う場合、まな板の洗浄・殺菌を行うことが重要であることが明確に示された。また、汚染源との接触面積が広いほど汚染率、汚染発生率ともに高いことを見える化した。除菌・殺菌モデル実験により、トレーや調理台がドリップなどで汚染したときは、肉汁等をふきんで除去した後に、殺菌剤を噴霧することで、完全に調理台表面等から *C. jejuni* を除菌・殺菌できることを確認した。調理器具からの三次汚染伝播やドリップによる汚染は、過去の食中毒発生原因として考えられており、Direct-qPCR 法でシミュレーション実験することで、食中毒の原因究明や改善策の効果検証に活用可能である。

本研究では Wrap 処理と Direct-qPCR 法を組み合わせることで *Campylobacter* 属菌の生菌数を推計し、これまで不明確だった市販食品の汚染や調理段階の生残実態を解明できた。また低菌量でも検出可能であり、手順が簡便であることから繰り返し実験し、モデル実験において *C. jejuni* を完全に除菌・殺菌できたことが確認できる。*Campylobacter* 食中毒は低菌量の摂取で発症することから、定性分析が確実にできる本法はリスクアセスメントを進める上で意義深い。さらに、本法は他の食中毒菌の定量的検出に応用可能であり、他の調理法に

についてもモデル実験を構築しデータを収集すれば、食中毒発生予防のためのリスクアセスメントへの貢献が期待される。このようなフードチェーン下流の生残実態の見える化が、調理従事者や一般消費者に対するリスクコミュニケーションを推進し、広義としての食中毒予防に貢献できると考える。

参考文献

- 浅野瞬, 改良 *Campylobacter jejuni* 定量法による交差汚染伝播実態の可視化, 名古屋学芸大学大学院修士論文 (2021)
- 石田史也, リアルタイム PCR を用いた *Campylobacter jejuni* 定量法の開発と伝播汚染実態の解明, 名古屋学芸大学大学院修士論文 (2017)
- 伊藤智, 岸本満, カンピロバクター・ジェジュニの調理段階における三次汚染率と除菌・殺菌効果の解明, 日本防菌防黴学会誌. 51 (3) (2023)
- 伊藤智, 岸本満, カンピロバクター属菌の検出率が上がるドリップシート検査とシートラップ法, 名古屋栄養科学雑誌. 5. P.75-83 (2019)
- 伊藤智, 村岡正章, 川口磨, 岸本満, 日本食品微生物学会学術総会講演要旨集. P.70. 2019
- 小野一晃, 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. P.442-448 (2014)
- 厚生労働省, カンピロバクター食中毒予防について (Q&A)
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000126281.html> (2022)
- 厚生労働省, 食中毒統計資料 食中毒 - 統計資料
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
(2022)
- 食品安全委員会, 微生物・ウイルス合同専門調査会: 食品健康影響評価のためのリスクプロファイル〜鶏肉を主とする畜産物中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ〜 (2006)
- 食品安全委員会, 微生物・ウイルス・寄生虫評価書 豚の食肉の生食に係る食品健康影響評価 (2015)
- 公益社団法人日本食品衛生協会, 食品衛生検査指針 微生物編 改定第2版, P.312 (2018)
- 国立医薬品食品衛生研究所, 食品からの微生物標準試験法 カンピロバクター.
http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/pdf/protocol/NIHSJ-02_2019.pdf (2019)
- 長谷川専, カンピロバクターリスク評価 -確率論的アプローチによる生鶏肉のカンピロバクター食中毒のリスク評価とその対策の効果分析-, 食品衛生研究. 63 (8) P.23-33 (2013)
- 松本哲哉, 最新臨床検査学講座 臨床微生物学, P.184-186, 医歯薬出版 (2019)

- 三澤尚明, カンピロバクターとヒトとの戦い 人類は多様な生存戦略を持つカンピロバクターを防除できるのか?, 食品微生物学会誌.31 (3). P.144-147 (2013)
- 三澤尚明、近藤房生、後藤公吉、斎藤志保子、川森文彦、小野一晃、重茂克彦、品川邦汎, 人および鶏肉由来 *Campylobacter jejuni* HS:2 および HS:19 血清型株の PCR-RFLP 法による遺伝子解析, 日本獣医師会学会誌. 56 (7) P.471-475 (2003)
- 村田晃、日高敏勝、神田康三、加藤富民雄, 2 価鉄の殺菌作用と作用機序, 佐賀大学農学部彙報. 93. P.141-155 (2008)
- Berndtson, E., Distribution and numbers of *Campylobacter* in newly slaughtered broiler chickens and hens. Int. J. Food Microbio. 15. P.45-50 (1992)
- Bojan, P., Mateja, P., and Darja, K., New approaches on quantification of *Campylobacter jejuni* in poultry samples. Front. Microbio. 8. P.1-13 (2017)
- Callicott K. A., Hjoardottir, F. Georgsson, et al. Broiler *Campylobacter* contamination and human campylobacteriosis in Iceland. Appl. Environ. Microbiol.74. P.6483-6494 (2008)
- Corry, L., J. E. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Journal of applied microbiology. 90. 96S-114S (2001)
- Hayashi, M., Hayashi, S., Ezaki, T., Use of blood free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat. Int. J. Food Microbiol. 163. P41-46 (2013)
- Hong, J., Jung, W. K., Kim, J. K., et al. Quantification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. J. Food Prot. 70. P.2015-2022 (2007)
- Igimi, S., H. Asakura, Y. Okada, and Y. Momose., Basic research for the control of *Campylobacter* food poisoning. Jpn. J. Clin. Med. 70. P.1298-1303 (2012)
- International Organization for Standardization. 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations (2007)
- International Organization for Standardization Technical specification 10272-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.-Part 2:colony-count technique. International Organization for Standardization, Geneva (2006)

- Kathrin S, Edda B, Christine S, Goetz H. Quantification of *Campylobacter* on the surface and in the muscle of chicken legs at retail. 69. P.757-761 (2006)
- Kapa Biosystems. KAPA3G Plant PCR Kit Technical Data Sheet. Available at: <https://www.n-genetics.com/products/1104/1023/13695.pdf>. Accessed 23 September 2022.
- Kittl, S., B. M. Korczak, L. Niederer, A. Baumgartner, S. Buettner, G. Overesch, and P. Kuhnert. Comparison of genotypes and antibiotic resistances of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on chicken retail meat and at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* 79. P.3875-3878 (2013)
- Kojima, C., Kishimoto, M., and Ezaki, T. Development of rapid screening of *Campylobacter* spp. and the GyrA mutants using PCR-DNA strip and real-time PCR. *Jpn. J. Food Microbiol.* 33 (1) P.12-18 (2016)
- LPSN: Genus *Campylobacter*. 2020 年 11 月時点 <http://lpsn.dsmz.de/genus/campylobacter>
- Magaz-Martinez M, Garrido-Botella A, Pons-renedo F, Oliva-del-Rio B, agudo-Castillo B, Ibarrola-Arevalo P, Abreu-Garcia LE, Fatal *Campylobacter jejuni* ileocolitis. *Revista espanola de enfermedades digestivas.* 108. P.662-663 (2016)
- Misawa, N. Strategies for post-harvest control of *Campylobacter*. *Jpn. J. Vet. Med. Assoc.* 65. P.617-623 (2012)
- Moore, J. E. Bacterial dormancy in *Campylobacter*: abstract theory or cause for concern? *Int. J. Food Sci. Technol.*, 36, P.593-600 (2001)
- Nauta M., I. van der Fels-Klerx, and A. Havelaar. A poultry-processing model for quantitative microbiological risk assessment. *Risk Analysis.* 25. P.85-98 (2005)
- Ono, K, Ymamamoto K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 47 (3) P.211-219 (1999)
- Ricke, S. C., Feye, K. M., Chaney, W. E., Shi, Z., Pavlidis, H., and Yang, Y. Developments in rapid detection methods for the detection of foodborne *Campylobacter* in the United States. *Fron. Microbiol.* 9. P.1-19. (2019)
- Ruiz-Palacios, G. M. The Health Burden of *Campylobacter* Infection and the Impact of Antimicrobial Resistance: Playing Chicken. *Clinical infectious diseases.* 44(5). P.701-703 (2007)
- Sabaïke, I. Yamazaki W. Improving detection accuracy and time for *Campylobacter coli* in natural

- infected live and slaughter chicken broilers using a real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification approach. *J. Food Prot.* 82 (2). P.189-193 (2018)
- Sails, A. D., A. J. Fox, F. J. Bolton, D. R. Wareing, and D. L. Greenway. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 69. P.1383-1390 (2003)
- Satoshi Ito, Michiru Kishimoto, Development of a sampling and real-time PCR method for the quantitative detection of *Campylobacter* spp. in retail chicken meat without DNA extraction, *J. Food Prot.*, 86 (2023)
- Scherer, K., E. Bartelt, C. Sommerfeld, and G. Hildebrandt. Quantification of *Campylobacter* on the surface and in the muscle of chicken legs at retail. *J. Food Prot.* 69. P.757-761 (2006)
- Schrader C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne, PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113. P.1014-1026 (2012)
- Son, Insook. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *Int. J. Food Microbiol.* 113 (1) P.16-22 (2007)
- Teunis, P. F., Van Den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., Van Den Kerkhof, H., and Van Pelt, W. A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol Infect.* 133. P.583-592 (2005)
- Toplak, N., Kovac, M., and Jersek, B. Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. *J. Appl Microbio.* 112. P.752-764 (2012)
- Ueno, H., T. Usuku, S. Matsuba, K. Kawai, T. Ohta, T. Tasaka and C. Morita. A bacteriological survey of raw chicken meat at retail shops in Ebetsu city from 1987 to 1992. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 48. P.281-284 (1995)
- Verhoeff-Bakkenes, L., Beumer, R. R., Jonge, R., Van Leusden, F. M., Jong, A. E. Quantification of *Campylobacter jejuni* cross-contamination via Hands, Cutlery, and Cutting Board during preparation of a Chicken fruit salad. *J. Food Prot.* 71 (12) P.2448-2452 (2008)
- Willis, W. L., and C. Murray. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. *Poult. Sci.* 76. P.314-317 (1997)
- Yao, B., Xiao-Hui, Z. C., Shao-Fei, Y., Wei, W., Jin, X., and Feng-Qin, L. Quantification of Cross-

- Contamination of *Campylobacter jejuni* during Food Preparation in a Model Kitchen in China. J. Food Prot. 84 (5) P.850-856 (2021)
- Yokoyama, K. *Campylobacter* food poisoning in Tokyo. Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health. 68. P.13-24 (2017)
- Yoymi, J., Oh, H., Yoon, Y., Lee, S., Ha, J., Kim, W., Kim, H., Han, S., and Kim, S. Enrichment broth for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in fresh produce and poultry. J. Food Prot. 80. P.1842-1850. (2017)

謝辞

本研究は、科学研究費補助金（課題番号 JP19K10587）および神戸学院大学健康科学研究助成金により実施されました。

本研究で使用した *Campylobacter jejuni* は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトにより理研 BRC から提供されました。

本研究を遂行するにあたり、岸本満教授には終始適切なお助言を賜り、熱心なご指導をいただきました。6年間にわたり研究者として未熟な私を導いていただきました。心から深謝いたします。

本論文の作成にあたり審査、ご指導いただきました三重大学大学院 生物資源学研究科 福崎智司教授、本学 和泉秀彦教授、井澤一郎教授に厚く御礼申し上げます。また、環境衛生学研究室の皆様には、いつも快くご協力いただきました。ここに感謝の意を表します。

最後に、社会人学生として研究に打ち込むことを理解し、支えてくれた家族に感謝いたします。