

氏名	伊藤 智
学位の種類	博士 (栄養科学)
学位番号	第19号
学位授与年月日	令和5年3月20日
学位論文名	<i>Campylobacter</i> 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
論文審査委員	主査 教授 和泉 秀彦 副査 福崎 智司 副査 教授 井澤 一郎 副査 教授 岸本 満

## 論文内容の要旨

### 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。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、トレー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。

## 論文審査の結果の要旨

日本で最も多い食中毒は *Campyrobacter* 属菌によるもので、鶏肉の生あるいは加熱不足による摂取が原因とされ、低菌量で発症する。食中毒発症防止には、フードチェーン下流（調理段階）での対策が重要である。しかし、低菌量の *Campyrobacter* 属菌を高感度で検出・定量する方法は確立されていないのが現状である。本博士論文は、*Campyrobacter* 属菌の検出系の確立およびフードチェーン下流における伝搬実態の解明をテーマに進められており、一貫したものとなっている。

第1章では、*Campyrobacter* 属菌、それによる食中毒および予防対策について概説した。

第2章（研究1）では、*Campyrobacter* 属菌の低菌量でも検出・定量可能な手法を開発した。ここでは、独創性のある前処理法として Wrap 法を導入し、Direct-qPCR と組み合わせることにより新規な生残菌数の推計法を提案した。

第3章（研究2）では研究1で開発した手法を用いて、市販鶏肉中の *Campyrobacter* 属菌を検出・定量した。その結果、開発した手法による *Campyrobacter* 属菌の検出率や定量率は、公定法である培養法のそれと比較して、高感度であったことを明らかにした。

第4章（研究3）では、研究1で開発した手法を用いて、調理モデル実験を行い、*Campyrobacter* 属菌の三次汚染率を明らかにした。さらに、除菌・殺菌モデル実験を行い、*Campyrobacter* 属菌が低減する現象を見える化した。

*Campyrobacter* 属菌による食中毒の予防は、食品衛生の分野で重要なテーマであり、博士論文のテーマとして妥当である。論文の内容は、これまでの *Campyrobacter* 属菌の検出・定量法を良く理解し、その問題点を解決するために、独創性のある前処理法として Wrap 法を開発し、Direct-qPCR 法との組み合わせにより、新規の菌数測定法を提案している。この手法の開発は、栄養科学、特に食品衛生の分野において十分貢献できる有用性をもっている。本博士論文の内容は、食品事業者や調理従事者、一般家庭へも *Campylobacter* 属菌の食中毒リスクを科学的データに基づいて提供することができ、自身の調理操作を振り返るきっかけとなるなど、広義としての食中毒予防に貢献するものである。さらに、他の食中毒菌の定量的検出法に応用し、様々な調理条件・調理法を想定した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に発展することも期待できる。研究は、多数の国内外での先行研究を十分に理解した上で実施されており、目的に沿った実験方法・解析方法により適切に行われている。論文構成は、*Campyrobacter* 属菌の定量法の開発、それを利用した検出といった流れになっており、適切である。審査における質疑応答では、研究課題の範囲に限らず幅広い栄養学的学識を備えており、十分な情報収集を行って自分の研究の意義を理解し、他研究との比較もしっかり行っていた。

研究のまとめ方、研究結果および考察、発表会・最終試験における質問に対する受け答えなどについて、総合的に評価したところ、博士の学位を与えるのに適切であると判断した。