

## 【原著】

# 凍結環境が *Campylobacter* 生存に与える影響に関する調査

藤岡美幸\*<sup>1</sup> 木村俊太\*<sup>2</sup> 野坂大喜\*<sup>1</sup>

(2019年8月2日受付, 2019年8月19日受理)

**要旨:** 近年 *Campylobacter* は食中毒原因菌の上位に位置し, 各分野で対応に取り組んでいるが, 事件数は減少していない現状がある。原因食材としてトリ肉が知られており, 冷凍状態で流通する外国産の汚染が少ないことや冷凍による菌数減少の報告もあることから, 本研究では凍結環境が *Campylobacter* に与える影響について調査した。*C. jejuni* および *C. coli* 各 10 株を対象に検討した結果, いずれも 1 回の凍結操作で生菌数が激減した。連続冷凍期間は最大で 21 日間生菌数が認められたが, 凍結と解凍を繰り返した場合, 2~3 回で対象としたすべての *Campylobacter* が死滅した。以上より, *Campylobacter* は凍結によりダメージを受けやすく, 保有菌数を減少させることが期待できるため, 特に国産トリ肉では流通過程などで一度凍結することが食中毒の予防に有効であると考えられた。

**キーワード:** *Campylobacter*, 凍結期間, 再凍結, 食中毒

## I. はじめに

*Campylobacter* は 1982 年に食中毒起因菌に指定されて<sup>1)</sup>以来, 散发性下痢症患者から高頻度に検出され, わが国における細菌性食中毒の原因菌の上位を占めている<sup>2)</sup>。ヒトから分離される *Campylobacter* はその 90%以上が *C. jejuni*, 数%が *C. coli* とされる<sup>3)</sup>。*Campylobacter* 感染の主な症状は腹痛や下痢, 嘔吐などであるが, 一般に予後良好で, 原則として抗生物質の投与を必要としない。しかしながら, *C. jejuni* の後続症としてギラン・バレー症候群が知られていることから, 重篤な症状や敗血症などの併発を認めた患者には適切な抗生物質治療を必要とする<sup>2)</sup>。*Campylobacter* による食中毒の原因には主としてトリ肉や生乳, 飲料水に起因し, 特にトリは腸管内に高率で *Campylobacter* を保有していることから, 食肉処理工程でトリ肉が *Campylobacter* に汚染されている可能性が大きい<sup>4)</sup>。小野ら<sup>5)</sup>はトリ肉の *Campylobacter* 汚染は国産が 96.0%, 外国産が 16.0%と報告している。外国産は流通過程において凍結状態で輸入される<sup>6)</sup>ことが挙げられ, 凍結による *Campylobacter* の菌数減少の報告<sup>7)</sup>もあることから, 凍結保存, 店頭陳列時や調理時の解凍が菌数減少に関与している可能性が考えられる。そこで, 本研究では *Campylobacter* の凍結状態の抵抗性と, 解凍, 再凍結の繰り返しが生菌数に与える影響について調査した。

## II. 対象および方法

### 1. 対象

当施設にて -80℃で凍結保存された下痢症患者由来 *Campylobacter* 330 株のうち, 無作為抽出した *C. jejuni* 10 株, *C. coli* 10 株を対象とした。

### 2. 方法

対象保存株はヒツジ血加普通ブイヨン (ニッスイ) に接種し, 42℃, 22±2 時間微好気下で前培養を行った後, ヒツジ血加 HI 寒天培地 (ニッスイ) に接種, 48 時間微好気培養 (アネロパック, 三菱ガス化学) した。平板上に発育したコロニーを 1%NaCl 加普通ブイヨンに接種し, 同様の条件で 48 時間培養したものを培養原液とした。これらの培養原液を対象に 96 穴プレート (IWAKI) を用いて 1%NaCl 加ブイヨンにて 10<sup>12</sup> 倍まで階段希釈を行った後, 直ちに -30℃にて凍結保存し, 連続凍結および再凍結を繰り返した際の生菌数の変動を検討した。生菌数はこのプレートを微好気条件下で培養を行い, 混濁を認めた最小濃度から算定した。

#### 1) 凍結保存期間による生菌数算定

凍結保存期間は 1~7 日間までは連日, それ以降は 14, 21, 28 日間とした。各期間対象プレートを室温で完全溶解後, 42℃, 48 時間微好気培養を行い, 混濁を認めた最小濃度から生菌数を算定した。

#### 2) 凍結と解凍を繰り返した際の生菌数算定

再凍結操作ではすべてのプレートを室温で完全溶解後, 該当する回数のプレートは 42℃, 48 時間微好気培養を行い, 混濁を認めた最小濃度から生菌数を算定した。また当該回数以降用のプレートはそのまま再度 22±2 時間凍結した。この操作は生菌数を認めなくなるまで繰り返した。

\*1 弘前大学大学院保健学研究科  
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences  
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-39-5970  
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

\*2 弘前大学医学部保健学科  
Hirosaki University School of Health Sciences  
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111  
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan  
Correspondence Author mfujioka@hirosaki-u.ac.jp

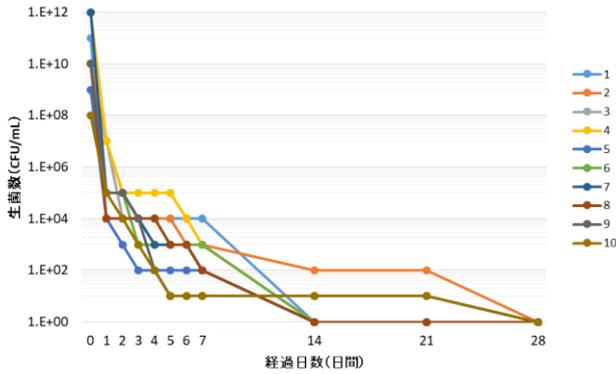


図1 *C. jejuni* における連続凍結による生菌数変化

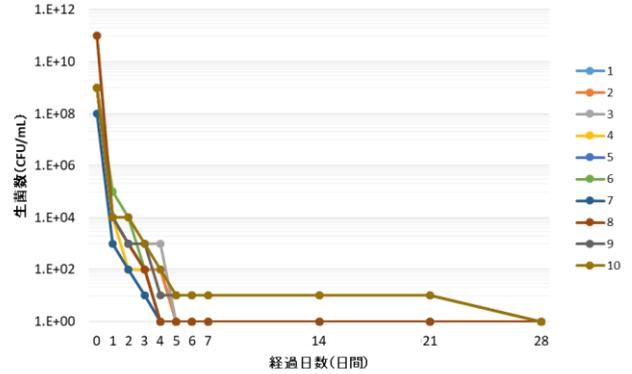


図2 *C. coli* における連続凍結による生菌数変化

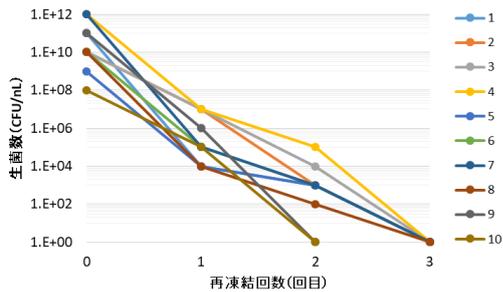


図3 *C. jejuni* における再凍結による生菌数変化

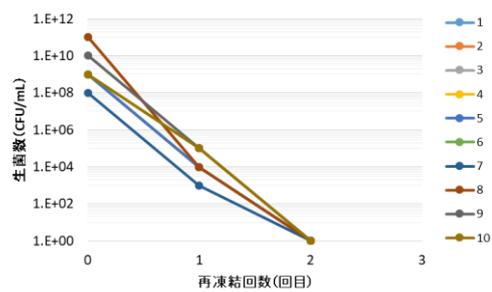


図4 *C. coli* における再凍結による生菌数変化

### III. 結果

#### 1. 連続凍結における生菌数の変化

##### 1) *C. jejuni* における生菌数

*C. jejuni* における連続凍結検体中の生菌数を図1に示す。凍結前の生菌数は  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$  CFU/mL であった。凍結1日間では  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$  CFU/mL, 2日間では  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$  CFU/mL となり, 3日間以降は急激な菌数の減少はみられなかった。対象とした10株すべてが7日間まで生菌を認めたが14日間では3株のみ発育を認めた。この3株は21日間まで生存していた。

##### 2) *C. coli* における生菌数

*C. coli* における連続凍結検体中の生菌数を図2に示す。凍結前の生菌数は  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$  CFU/mL であった。凍結1日間では  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$  CFU/mL, 2日間では  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$  CFU/mL となり, 3日間には  $1 \times 10 \sim 1 \times 10^3$  CFU/mL と減少し, 4日間には半数が生菌の発育を認めなかった。7日間には2株のみ生菌を認め, この2株は21日間生存していた。

#### 2. 再凍結操作における生菌数変化

再凍結における生菌数変化について, いずれも1回の凍結操作で激減し, *C. jejuni* は3回目, *C. coli* は2回目には生菌数を認めなくなった(図3, 4)。

### IV. 考察

近年サルモネラや腸炎ビブリオによる食中毒は減少しているが, *Campylobacter* による食中毒は増加傾向にある。厚生労働省や農林水産省, 文部科学省の各政府機関から1999年にはサルモネラ, 2001年には腸炎ビブリオ対策などが策定された<sup>8)</sup>。2003年には食品安全基本法の制定や食品衛生法の一部改訂がなされ<sup>9)</sup>、リスク評価を踏まえて、病原微生物による健康被害の低減化対策が進められてきた<sup>8)</sup>。しかしながら *Campylobacter* は100個程度の菌数の摂取で食中毒を起こすとされる<sup>10)</sup>ことから, その対策の困難性が窺える。2009年には *Campylobacter* 食中毒を低減化する目的で *Campylobacter* のリスク評価が行われ, 飲食店での鶏肉の生食による感染は生食しない人の約76倍であったとされた<sup>11)</sup>。トリをはじめ, ウシ・ブタ肉は生食用食肉の流通はない<sup>12)</sup>ことから, これらの生食については注意喚起が必要である。また Kubota ら<sup>13)</sup>は散发発生の *Campylobacter* 感染者数を少なくとも年間24万人であると報告しており, *Campylobacter* による食中毒事例の実数はかなり多いことが予想される。*Campylobacter* の特性を知り感染経路を絶つことは, 感染症の3要素<sup>14)</sup>の観点からも食中毒防止には必須である。そこで本研究では *Campylobacter* の生菌数における凍結による影響を検討した。連続凍結1日間において, *C. jejuni* 株では  $10^2 \sim 10^7$  分の1, *C. coli* 株では  $10^4 \sim 10^7$  分の1に生菌数が減少し, いずれの種も減少幅は著しく大きかった。一方で2日間以降の生菌数は微減であり, これ以降7

日間までは対象株すべてにおいて大きな相違は認められなかった。14日間では *C. jejuni* 3株, *C. coli* 2株生存し, これら5株は21日間まで生存していた。以上より, *C. jejuni* および *C. coli* は1回の凍結操作で生菌数が激減するが, 連続凍結ではその後の生菌数がある程度保つことが示唆された。次に再凍結操作による生菌数の変化について, 1回目は連続凍結1日間と同じデータを示すが, 2回目の再凍結における *C. jejuni* 10株では  $10^{-10}$ 分の1に減少し, 2株は発育しなかった。3回目にはすべての株で発育を認めなかった。一方, *C. coli* では2回目にすべての発育を認めなかった。これは *Campylobacter* における凍結時の生菌数減少は凍結操作による菌体への損傷を示唆しており, 凍結時間よりも再凍結操作に影響を受けることが考えられた。また菌種間の相違について, *C. coli* は *C. jejuni* よりも損傷を受けやすいとの報告もあることから, 凍結操作が1回でも相当のダメージがあったものと予想される。一般に細菌の長期保存には  $-30 \sim -80^{\circ}\text{C}$ での凍結保存が行われるが, 細胞が損傷しないために, 保護剤としてスキムミルクやグリセリン等が用いられる<sup>15)</sup>。しかしながら *Campylobacter* はいずれの保存方法でも他細菌より死滅しやすく, 凍結操作による影響が大きいものと考えられる。よって少なくともトリ肉の流通過程において, 店頭に陳列するまで冷凍状態であれば, *Campylobacter* の生菌数を少なくすることが可能であり, また購入後すぐに使用しない場合は凍結あるいは加熱処理することが食中毒の予防に有効であると考えられる。食肉を凍結後, 解凍して調理することは素材の風味を損なうことに繋がるかもしれないが, 特に *Campylobacter* による食中毒防止の観点からは必要不可欠であると思われた。

**利益相反** 開示すべき利益相反はありません。

**謝辞** 本研究に遂行にあたり貴重な菌株をご提供いただきました弘前市医師会健診センター検査部の皆様に謹んで感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) 厚生省環境衛生食品衛生課長通知：ナグビブリオ, カンピロバクター等の食品衛生上の取り扱いについて. 環食大 59号：1982.
- 2) 坂崎利一：新訂 食水系感染症と細菌性食中毒. pp336-380, 中央出版株式会社, 東京, 2000.
- 3) 伊藤 武：カンピロバクター腸炎の発生状況. 医学のあゆみ, 135:1072-1073, 1985.
- 4) 伊藤 武, 高橋正樹, 他：市販食肉および食肉店舗や食鳥処理場の環境における *Campylobacter* の汚染状況ならびに分離菌株の血清型に関する研究. 感染症誌, 62: 17-25, 1988.
- 5) 小野一晃, 辻りえ, 他：国産および輸入鶏肉におけるカンピロバクターの汚染状況. 日本獣医師会雑誌. 56(2): 103-105. 2003.
- 6) 小野一晃, 安藤陽子, 他：冷凍保存鶏肉における *Campylobacter jejuni* の生存性とパルスフィールドゲル電気泳動による分離菌株の遺伝子解析. 日本食品微生物学会誌. 22(2): 59-65,

- 2005.
- 7) Solow BT, Cloak OM, et al.: Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin. J Food Prot, 66: 2023-2031, 2003.
- 8) 伊藤 武：増加してきたカンピロバクター食中毒の実態と制御. 東京顕微鏡院.  
<https://www.kenko-kenbi.or.jp/science-center/foods/topics-foods/75.html> (2019-07-31)
- 9) 厚生労働省：食品衛生法等の一部を改正する法律の概要.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/11131500/000345946.pdf> (2019-07-31)
- 10) Black RE, Levine MM, et al.: Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. J infect Dis, 157:472-479, 1988.
- 11) 伊藤 武：最近の食品事故について～主に微生物～. 東京微生物顕微鏡院.  
<https://www.kenko-kenbi.or.jp/science-center/foods/topics-foods/3230.html> (2019-07-31)
- 12) 全国食肉事業協同組合連合会：食肉衛生加工マニュアル 平成25年度食肉小売機能高度化推進事業.
- 13) Kubota K, Iwasaki E, et al.: The human health burden of food-borne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. Foodborne Pathog Dis, 5:641-648, 2008.
- 14) 厚生労働省 監修：食品衛生検査指針 微生物編. pp104-115, 日本食品衛生協会, 東京, 2004.
- 15) 永井利郎, 一木環樹, 他：日本のカルチャーコレクションとその業務. 日本食品科学工学会誌, 60(6): 257-265, 2013.

**【Original article】**

**The effect of freezing on *Campylobacter***

MIYUKI FUJIOKA<sup>\*1</sup> SHUNTA KIMURA<sup>\*2</sup>  
HIROYUKI NOZAKA<sup>\*1</sup>

(Received August 2, 2019 ; Accepted August 19, 2019)

**Abstract:** *Campylobacter* is the leading cause of bacterial food-poisoning in Japan. Although various organizations have been trying to address this issue, the number of cases has not decreased. Poultry consumption is known to be a source of *Campylobacter* infection. Interestingly, one report described that frozen imported poultry is associated with decreased *Campylobacter* contamination. In this study, we investigated the effects of freezing on two species of *Campylobacter*. For 10 strains each of *C. jejuni* and *C. coli*, the number of viable cells was sharply decreased with one cycle of freezing. *Campylobacter* strains could be cultured after a single freezing period of up to 21 days, but after repeated freezing and thawing, no *Campylobacter* strain was cultivable after repeated freezing and thawing even at two times or three times. These results suggested that *Campylobacter* is easily damaged by freezing, and that a single freeze during distribution is sufficient to reduce the *Campylobacter* load on poultry (especially domestic poultry) sufficiently to prevent food poisoning.

**Keywords:** *Campylobacter*, Freezing period, Refreeze, Food poisoning