

201205031A

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

食品に対する放射線照射による殺菌手法
及び効果判定手法の開発
並びに安全性に関する研究

平成24年度

総括 研究報告書

(課題番号：H24-特別-指定-011)

研究代表者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成25(2013)年5月

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

食品に対する放射線照射による殺菌手法
及び効果判定手法の開発
並びに安全性に関する研究

平成24年度 総括 研究報告書

(課題番号：H24-特別-指定-011)

研究代表者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成25(2013)年5月

目 次

- I. 平成 24 年度総括研究報告書
 - 食品に対する放射線照射による殺菌手法及び効果判定手法の開発並びに
安全性に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
 - 研究代表者 五十君 静信

- II. 分担・協力研究報告書
 - 1. 左肝管から人工的に注入した O157 の牛肝臓内での分布と
牛肝臓内及び胆汁から分離した細菌の菌種同定・・・・・・・・ 5
 - 山崎 伸二、日根野谷 淳

 - 2. モデル食品の作成と殺菌効果判定手法の検討・・・・・・・・ 11
 - 五十君 静信、江川 智哉、梶田 和彌、岡田 由美子、朝倉 宏

 - 3. 照射線量及び照射形態（生と冷凍の比較、包装形態等）の検討・・・・ 23
 - 等々力 節子、川崎 晋

 - 4. 対象食品における照射後に生成する副産物及びその安全性に
関する検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33
 - 等々力 節子、亀谷 宏美、川崎 晋

 - 5. 放射線照射による殺菌等の手法の対象となる食品の検討・・・・ 45
 - 等々力 節子、川崎 晋

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
食品に対する放射線照射による殺菌手法及び効果判定手法の開発
並びに安全性に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

現在、我が国では食品衛生法において「食品を製造し、又は加工する場合は、食品に放射線を照射してはならない。」とされており、食品に対する放射線照射による処理は原則認められていない。このような中、牛肝臓の内部が腸管出血性大腸菌により汚染される可能性があるとともに、それらを確実に除去する手法が見いだせないことから、牛肝臓の生食の安全性を確保する知見が得られるまでの間、生食用としての牛肝臓の提供が禁止されることになったところであるが、この規制については、食肉業者等から多くの反対の意見があることや経済的影響が大きいことから、牛肝臓の生食の安全性を確保する知見を早急に得、牛肝臓の生食の禁止解除が求められている。

このため、本研究では以下の手順で、牛肝臓に対する放射線照射による殺菌効果の有効性、安全性に関して検証を試みた。

- ・ 胆管からの人工汚染によるにおける牛肝臓内部への菌の浸透に関する検討
- ・ モデル食品の作成と殺菌効果判定手法の検討（採取部位、菌検出手法等）
- ・ 照射線量及び照射形態（生と冷凍の比較、包装形態等）の検討
- ・ 対象食品における照射後に生成する副産物及びその安全性に関する検討
- ・ 放射線照射による殺菌等の手法の対象となる食品に関する情報収集

これらの研究により、胆管からの人工汚染による牛肝臓の内部への腸管出血性大腸菌の浸透に関する知見、モデル食品の作成と殺菌効果判定手法の確立、人工汚染させた牛肝臓に対する放射線照射量及び照射形態の検討結果、並びに照射後に生成する副産物等に関する検討結果の提供、放射線照射による殺菌等の手法の対象となる食品に関する情報収集とその総括を行うことが出来た

研究分担者：

等々力節子：独）農研機構 食品総合研究所

研究協力者：

山崎 伸二：大阪府立大学大学院

川崎 晋：独）農研機構 食品総合研究所

日根野谷淳：大阪府立大学大学院

亀谷宏美：独）農研機構 食品総合研究所

江川 智哉：国立医薬品食品衛生研究所

榊田 和彌：国立医薬品食品衛生研究所

岡田由美子：国立医薬品食品衛生研究所

朝倉 宏：国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

現在、我が国では食品衛生法において「食品を製造し、又は加工する場合は、食品に放射線を照射してはならない。」と

されており、ジャガイモに対する発芽防止に用いる場合を除いて、食品に対する放射線照射による殺菌等の処理は認められていない。諸外国においても、食品への放射線照射については、慎重な検討が進められている中、米国では食肉、EU及びオーストラリアでは香辛料などに使用されているほか、アジア諸国でも食品への放射線照射が行われるなど、国際的な機関（WHOやCodex、EFSA）において、安全性の検証が進められている。

このような中、我が国でも、平成17年には食品への放射線照射の活用を検討する旨の閣議決定がなされ、香辛料への殺菌に放射線照射の使用が検討されているほか、平成23年3月に発生した生食用食肉（ユッケ）による腸管出血性大腸菌による食中毒事件を受けた生食用の牛肉、牛肝臓に対する規制強化の中で、食肉に対する放射線照射の可能性について検討が要望されているところである。

特に、牛肝臓については、薬事・食品衛生審議会において、牛肝臓の内部が腸管出血性大腸菌により汚染される可能性があるとともに、それらを除去する手法が見いだせないことから、牛肝臓を生食用として販売することを禁止する規格基準を設定すること及び牛肝臓の生食の安全性を確保する知見が得られた際には改めて審議することが答申されたところである。

本答申の審議の中で募集されたパブリックコメントにおいては、食肉業者や牛肝臓の生食愛好者等から1500件に及ぶ反対意見が寄せられているほか、試算では100数十億円に及ぶ経済的影響があることから、審議会答申でも「牛肝臓の生食の安全性を確保する知見が得られた際には改めて審議する」旨の内容が盛り込まれており、牛肝臓の生食の安全性を確保する知見を早急に得、牛肝臓の生食の禁止解除が求められている。

現在のところ、肝臓内部の菌を殺菌す

る方法としては、諸外国でも利用されている放射線照射方法が、有効性等の観点から最も有望であり現実的な方法と考えられることから、本研究においては、食品に対する放射線照射の活用を検討する一環として、牛肝臓を対象食品に殺菌手法や効果判定手法の開発、安全性に関する検証を行うものである。

B. 研究方法

①胆管からの人工汚染によるにおける牛肝臓内部への菌の浸透に関する検討

牛肝臓へ腸管出血性大腸菌がどのように拡散していくのかについて、左肝管を通じて牛の肝臓左葉内に人工的に腸管出血性大腸菌を注入し、肝臓への菌の分布を調べた。と殺直後の牛肝臓及び胆汁それぞれ30検体から大腸菌群の分離を試み、分離された菌株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき分離菌の菌種を同定した。

②モデル食品の作成と殺菌効果判定手法の検討（採取部位、菌検出手法等）

放射線照射により殺菌する必要のある菌種（腸管出血性大腸菌等）及びその摂取部位の検討を行う。本研究では、モデル食品として牛肝臓（生）を用い、接種する菌種として腸管出血性大腸菌および、毒素産生性を失った病原性のない大腸菌について検討し、殺菌効果を検証する実験に用いる菌株を決定した。また、実験を実施するにあたっての包装形態についても検討した。殺菌の評価については、牛肝臓の加熱による菌の挙動を基に、殺菌効果判定手法の検討を行った。

③照射線量及び照射形態（生と冷凍の比較、包装形態等）の検討

放射線照射に当たっては、従前より照射による副産物の安全性が問題となっていることから、目的を達するための必要かつ十分な吸収線量の検討を行った。また、生物に対する照射については生の状態と冷凍の状態により効果に差があると

の知見があるとともに、包装形態によっても効果に差が生じる可能性があることから、もっとも効果的な照射形態について検討を行った。

④対象食品における照射後に生成する副産物及びその安全性に関する検討

殺菌可能なレベルの放射線照射を行った牛肝臓について、食品としての健全性（栄養適性、毒性学的安全性）や品質（フレーバー、色調）などについて検討した。対象食品において放射線照射後に生成する特異的分解生成物を特定するとともに、その生成量や安全性について検討を試みた。

⑤放射線照射による殺菌等の手法の対象となる食品に関する情報収集

今回、モデル食品として取り上げる牛肝臓に対し、放射線照射により殺菌を行うことの妥当性検討と併せて、放射線照射以外に有効な手法が見当たらないなど、放射線照射による安全性の懸念に比べ、食品の安全への効果が高く、放射線照射が有効に働く食品に関する情報収集を行った。

C. 研究結果

①胆管からの人工汚染によるにおける牛肝臓内部への菌の浸透に関する検討

注入後の牛肝臓左葉内における腸管出血性大腸菌 O157 の分布を調べたところ、辺縁部を含む調べた 9 カ所ではほぼ一様に約 10^5 colony forming unit (cfu) の O157 を検出した。と殺直後の牛肝臓及び胆汁それぞれ 30 検体から大腸菌群の分離を試みたところ 9 検体から菌が分離された。分離された菌は、16srRNA 配列により、筋腫を同定した。

②モデル食品の作成と殺菌効果判定手法の検討（採取部位、菌検出手法等）

牛生レバーに人工的に腸管出血性大腸菌 O157 を汚染させ、殺菌効果判定方法の検討を行った。また、放射線殺菌で期待するのと同じレベルの殺菌効果が期待

されるように加熱条件を設定し、殺菌効果判定手法を用いて、加熱による殺菌効果の有効性を検証した。検証過程において、モニターに有用な O157 の菌株を選定した。

③照射線量及び照射形態（生と冷凍の比較、包装形態等）の検討

牛肝臓中での腸管出血性大腸菌の γ 線照射による殺菌効果について検討を行い、殺菌に必要とされる線量と牛肝臓部位差のデータを取得した。望ましい γ 線照射形態について検討するため、冷蔵・冷凍および包装条件下での殺菌効果を比較した。牛肝臓中での γ 線照射による殺菌には、従来 of 報告で示された牛挽肉殺菌試験結果よりやや高めの線量が必要であった。

④対象食品における照射後に生成する副産物及びその安全性に関する検討

フィルム包装したと畜直後の新鮮な肝臓（約 550g 塊）を、氷冷（0～2℃）3kGy およびドライアイス凍結下（-76～-80℃）5kGy で照射し、一般栄養成分、脂質酸化指標（TBA 値、過酸化価）、ビタミン含量、色調変化を検討した。その結果、氷冷照射の方が凍結照射に比べて成分変化の度合いが大きく、0℃ 3kGy 照射の試料ではチアミン（ビタミン B1）含量が 87% に、総アスコルビン酸（ビタミン C）およびビタミン B6 含量も僅かに減少した。凍結（ドライアイス下；-80℃）5kGy 照射では、チアミンの微少な減少を除き一般栄養成分やビタミン含量に非照射試料との差は認められなかった。

⑤放射線照射による殺菌等の手法の対象となる食品に関する情報収集

諸外国における、食品の放射線照射の許可と実用化についての情報を整理した結果、香辛料や乾燥野菜についての殺菌が多く of 国で実施されているほか、限られた数量の冷凍魚介類（冷凍エビ）、カエル脚、牛挽肉および鶏肉が、食中毒細菌（腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、サル

モネラ属菌)などの低減化を目的として照射されている実体が明らかになった。詳しくは分担研究報告書を確認していただきたい。

D. 結論

①胆管からの人工汚染によるにおける牛肝臓内部への菌の浸透に関する検討

牛肝臓内の大腸菌群細菌汚染は、胆汁由来と考えられた。牛肝臓の左肝管に人工的に約 2×10^7 cfu の O157 を注入すると牛肝臓全体に約 10^5 cfu/g の O157 が分布することがわかった。

②モデル食品の作成と殺菌効果判定手法の検討(採取部位、菌検出手法等)

牛肝臓に対する加熱による殺菌効果の有効性を評価する方法を確立した。この方法は、放射線殺菌の効果を評価する方法として利用可能と思われる。また、評価に有用な O157 の菌株を選定し、加熱による試料の中心部の温度を計測する方法についても検討した。腸管出血性大腸菌 O157 を牛肝臓に接種し、加熱による殺菌効果の有効性を検証した。

③照射線量及び照射形態(生と冷凍の比較、包装形態等)の検討

牛肝臓中での γ 線照射による殺菌効果については、従来の報告で示されている挽肉での殺菌試験結果よりやや高めの照射が必要であった。さらに、冷凍下ではより顕著に観察され、挽肉での事例と比較して高い線量の照射が必要であった。

一般に、放射線照射は食品自身の劣化防止のため低温かつ酸素濃度を低下させた環境での照射が望まれるが、殺菌効果を含めて考慮した場合、上記条件下での照射は品質評価と共に慎重に検討すべきである。

④対象食品における照射後に生成する副産物及びその安全性に関する検討

牛肝臓のガンマ線照射による栄養成分およびビタミン類の含量、脂質酸化指標(TBA 価、過酸化物質価)を調査した。氷

冷(0~2°C) 3kGy 照射によりチアミン(ビタミン B1) 含量が 87%に、総アスコルビン酸(ビタミン C)およびビタミン B6 含量も僅か減少した。凍結(ドライアイス下; -80°C) 5kGy 照射では、チアミンの微少な減少を除き非照射試料との差は認められなかった。

⑤放射線照射による殺菌等の手法の対象となる食品に関する情報収集

文献調査の結果、放射線殺菌の研究対象には、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、リステリアを取り上げたものが多く、対象食品は、食肉や肉製品の他、サラダやカットフルーツなども含む調理済み食品(RTE)に放射線殺菌を応用するための研究にも拡大が見られた。また、国や地域に特徴的な食品の衛生化を目的とした研究例も少数ながら見られた。牛肝臓を汚染する腸管出血性大腸菌等に関連した研究例は見当たらなかった。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

1. 山本茂貴、春日文子、五十君静信、岡田由美子、百瀬愛佳、朝倉宏。生食用食肉の規格基準の考え方。日本食品微生物学会雑誌。29:98-100 (2012)
2. 五十君静信。標準試験法の検討と生食用食肉の規格基準への採用。月刊フードケミカル 12 月号。332:61-64 (2012)

学会発表

なし

講演・研修会等

なし

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

平成 24 年度 厚生労働科学研究費 厚生労働科学特別研究事業
食品に対する放射線照射による殺菌手法及び効果判定手法の開発
並びに安全性に関する研究

協力研究報告書

分担研究課題名 左肝管から人工的に注入した O157 の牛肝臓内での分布と牛肝臓内及び胆汁から分離した細菌の菌種同定

研究協力者：山崎 伸二 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
日根野谷 淳 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

研究要旨：左肝管を通じて牛の肝臓左葉内に人工的に腸管出血性大腸菌 O157 を注入した。注入後の牛肝臓左葉内における O157 の分布を調べたところ、辺縁部を含む調べた 9 カ所でほぼ一様に約 10^5 colony forming unit (cfu) の O157 を検出した。一方、と殺直後の牛肝臓及び胆汁それぞれ 30 検体から大腸菌群の分離を試みたところ 9 検体から菌が分離され、大腸菌群細菌は胆汁中と肝臓内の分布に相関性が認められた。16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき分離菌の菌種を同定したところ *Aeromonas hydrophila*、*Escherichia coli*、*Klebsiella oxytoca*、*Enterobacter* spp. 等であった。

A. 研究目的

牛肝臓内から腸管出血性大腸菌 O157 が検出されたことから生レバーの生食が禁止となった。しかし、生レバーの需要は大きく、現状の牛肝臓を生で食すると腸管出血性大腸菌感染症に罹患し、特に小児や老人では、溶血性尿毒症症候群や脳症を併発する可能性も否定できない。

牛肝臓内の腸管出血性大腸菌を含む大腸菌群の汚染は胆管を経由していると仮定し、本研究では、肝臓内の殺菌法の開発を目的とし、胆管から注入した腸管出血性大腸菌が肝臓内に一様に分布するかどうかを確認し、牛の肝臓内と胆汁にける大腸菌群の分布に相関性があるかどうか、牛肝臓や胆汁からまれに分離されることがある大腸菌群

の菌種を 16S rRNA 遺伝子の解析により同定した。

B. 研究方法

1. 用いた菌株と菌液の調整

腸管出血性大腸菌 O157:H7 堺株（以下 O157）を L-broth で 37°C、一夜浸透培養した。培養した菌液 200 μ L を新鮮な L-broth 100 mL に植菌し、約 2~3 時間培養した。O157 を遠心分離により回収し、滅菌 PBS で洗浄後、滅菌 PBS で懸濁し OD 600 を測定して菌数を概算した。O157 の懸濁液を滅菌 PBS で希釈し、L-agar に植菌し正確な生菌数を測定した。

2. 左肝管を通じて人工的に注入した腸

管出血性大腸菌の牛肝臓内での分布

先に調整した菌液（約 10^6 から 10^7 cfu/mL）20 mL を 50 mL のプラスチックシリンジを用いて左肝管から肝臓内に注入した。注入後 37°C で約 30 分間静置した後、消毒したナイフを用いて牛肝臓の左葉 9 カ所を切り出し、それぞれ約 50 g をストマック袋に入れ、等量の滅菌 PBS を添加後、ストマック処理を行った。ストマック処理後の液を滅菌 PBS で 10 倍段階希釈し、希釈液をセフィキシムとテルライトを含むソルビトールマッコニー（CT-SMAC）寒天培地に植菌し O157 の菌数を調べた。

3. 牛肝臓及び胆汁からの大腸菌群細菌の分離

牛肝臓から無菌的に約 50 g の組織を切り出しストマック袋に入れ、等量の滅菌 PBS を加えストマック処理を行った。ストマック処理後の液を滅菌 PBS で 10 倍段階希釈し、希釈液を SMAC 寒天培地に植菌し O157 の有無及び大腸菌群細菌の菌数を調べた。同様に牛胆汁も滅菌 PBS で 10 倍段階希釈し、希釈液を SMAC 寒天培地に植菌し O157 の有無及び大腸菌群細菌の菌数を調べた。

4. 分離した大腸菌群関連細菌の 16S rRNA 遺伝子解析に基づく菌種同定

分離した細菌からボイル法で鋳型 DNA を調製し、16S rRNA 遺伝子約 500 bp を増幅できるプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を精製後、塩基配列を解析した。

C. 研究結果

1. 左肝管を通じて人工的に注入した O157 の牛肝臓内での分布

牛肝臓左葉を図に記したように 9 カ所切断し、肝臓の組織 1 g あたりに含まれる O157 の菌数を測定した。その結果、O157 を注入した左肝管入り口から辺縁部においても大きな差は無く概ね約 10^5 cfu/g (5.8×10^4 から 3.62×10^5 cfu/g) の O157 が検出された。

2. 牛肝臓及び胆汁からの大腸菌群細菌の分離と 16S rRNA 遺伝子解析による菌種同定

82 検体の牛肝臓及び胆汁について大腸菌群細菌が検出されるかどうかを調べたところ、11 検体の牛胆汁から 10^3 cfu/g 以上の菌が検出され、同じ個体の肝臓から 10^3 cfu/g 以上の菌が検出された。得られた 16 個のコロニーの菌種を 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき解析したところ表に示したように *Aeromonas hydrophila*、*Escherichia coli*、*Klebsiella oxytoca*、*Enterobacter* spp. と同定された。

D. 考察

牛肝臓内の O157 汚染は牛をと殺する際、胆汁の逆流によることが原因となる可能性を考えて人工的に注入した O157 が肝臓内のどの辺りまで分布するかを調べた。また、牛肝臓内の O157 を殺菌するために胆管内を塩素系消毒薬で処理し、その後、急速冷凍及びチルド解凍することで肝臓内の O157 を殺菌する方法論の確立を考えている。その為には、O157 を 10^4 分の 1 に減らす方法論の確立が必要であり、今回 20 mL の 10^6 cfu/mL の O157 を左肝管から注

入することで、牛肝臓全体に約 10^5 cfu/g の O157 が分布することを確認した。今後、この系を用いて牛肝臓内部の殺菌法の評価を行って行く予定である。

無し

牛肝臓内の O157 の汚染源は、胆汁であるという作業仮説のもとで同一個体の牛肝臓と胆汁それぞれ 30 検体について調べた。その結果、調べた全ての検体で O157 は検出されなかったものの胆汁中に 10^6 cfu/g 以上の大腸菌群細菌が検出された場合、同一個体の牛肝臓からも 10^3 cfu/g 以上の大腸菌群細菌が検出された。さらに、牛肝臓内から分離された大腸菌群細菌の菌種は、16S rRNA 遺伝子の解析の結果、胆汁から分離された大腸菌群細菌と類似した菌種であった。このことは、牛胆汁中の細菌を検査することで牛肝臓内の細菌汚染を評価できる可能性を示している。今後さらに検体数を増やして調べて行く必要がある。

H. 知的財産権の出願、登録状況

無し

E. 結論

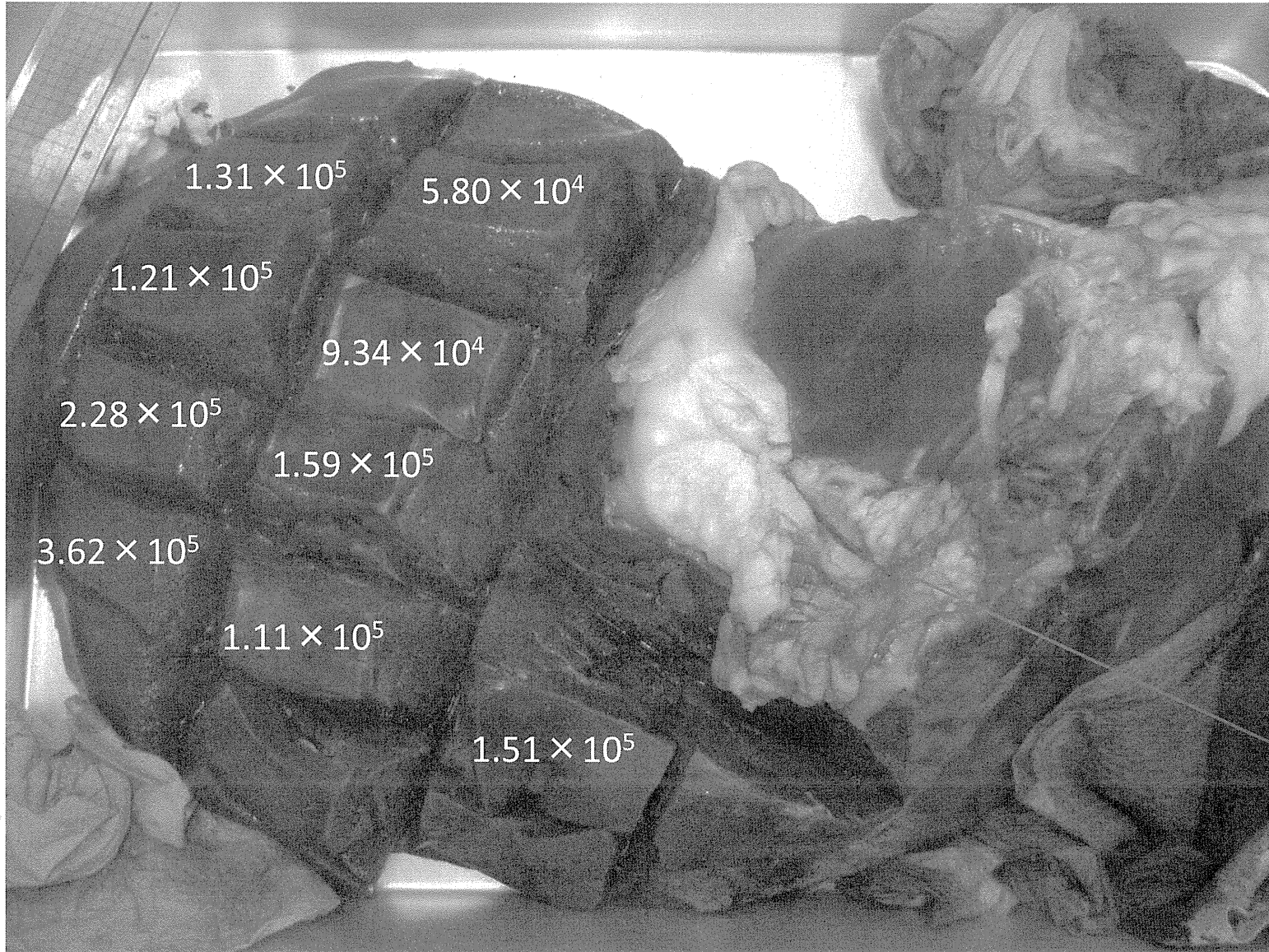
牛肝臓内の大腸菌群細菌汚染は、胆汁由来と考えられた。牛肝臓の左肝管に人工的に約 2×10^7 cfu の O157 を注入すると牛肝臓全体に約 10^5 cfu/g の O157 が分布することがわかった。

F. 健康危機情報

全ての肝臓ではないが一部の牛肝臓に、屠畜解体時の胆嚢からの胆汁の逆流によると思われる牛肝臓の大腸菌群汚染が認められた。大腸菌群細菌に汚染した牛肝臓を生で食べることは免疫力の弱い小児やお年寄りでは大きなリスクとなる可能性がある。

G. 研究発表

総胆管から注入したO157の牛肝臓内での分布



菌液:
20 mL EHEC O157:H7
(3.4×10^6 cfu/mL)

注入後
37°C、30分間静置

ホモジネート作製後、
SMACで培養

胆管左葉側

cfu/g 肝臓

牛肝臓と胆汁中に検出される大腸菌群数と菌種

30検体中、9検体で牛肝臓から $>10^3$ cfu/g以上の菌が検出され、同胆汁からも $>10^6$ cfu/g以上の菌が検出された。得られたコロニー16個に付いて16S rRNA遺伝子の解析を行った。

16S rRNA遺伝子の塩基配列解析による菌種の同定

菌株	菌種	塩基数*	菌株	菌種	塩基数*
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	429/431	9	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter</i> spp	426/427
2	<i>Escherichia coli</i>	447/450	10	<i>Enterobacter</i> spp, <i>Klebsiella oxytoca</i>	417/417
3	<i>Enterobacter</i> spp <i>Salmonella enterica</i>	442/449	11	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i>	387/387
4	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter</i> spp	463/466 462/466	12	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i>	387/387
5	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter</i> spp	419/420	13	<i>Escherichia coli</i>	405/405
6	<i>Raoultella</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp <i>Enterobacter aerogenes</i>	425/426	14	<i>Escherichia coli</i>	462/463
7	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter</i> spp	433/433 432/433	15	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i>	333/334
8	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter</i> spp	441/441 440/441	16	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> <i>Cronobacter sakazakii</i>	402/402

*一致した塩基数／解析した塩基数

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

平成 24 年度 分担研究報告書

食品に対する放射線照射による殺菌手法及び効果判定手法の開発並びに
安全性に関する研究

モデル食品の作成と殺菌効果判定手法の検討

研究代表者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

現在、我が国では食品衛生法において「食品を製造し、又は加工する場合は、食品に放射線を照射してはならない。」とされており、食品に対する放射線照射による処理は原則認められていない。牛肝臓の内部が腸管出血性大腸菌により汚染される可能性があり、内部への汚染を受けた肝臓については、生食用として提供することを想定した場合、腸管出血性大腸菌を確実に除去する手法が見いだせないことから、放射線照射による殺菌効果の有用性、安全性の検証を試みている。本分担研究では、牛生レバーに人工的に腸管出血性大腸菌を汚染させ、殺菌効果判定方法の検討を行った。さらに放射線殺菌と同じレベルの殺菌効果が期待されるように加熱条件を設定し、上述の殺菌効果判定手法を用いて、加熱による殺菌効果の有効性を検証した。検証過程において、モニターに有用な O157 の菌株を選定し、加熱による試料の中心部の温度を計測する方法についても検討を行った。

協力研究者

食品衛生管理部 江川 智哉

食品衛生管理部 榊田 和彌

食品衛生管理部 岡田 由美子

食品衛生管理部 朝倉 宏

菌効果を評価する。

B.研究方法

①加熱による殺菌効果の有効性を評価する方法を確立するため、「生食肉の腸内細菌科菌群 (Enterobacteriaceae) 検出試験法 (通知法)」を基に、試料や使用する培地を参考に、加熱による O157 の殺菌効果の評価方法を検討した。まず、試料の夾雑菌の影響を確認するため、検体を接種、非接種に分け、次にそれらを牛肝臓の流通形態から冷蔵、冷凍に分けた。さらに、加熱殺菌効果を評価するため、加熱/非加熱に分け、定性および定量的に菌を回収する方法を設定

A. 研究目的

牛肝臓に対する加熱による腸管出血性大腸菌 O157 の殺菌効果を検証するための評価方法を確立する。確立した評価方法を用いて放射線殺菌と同じレベルの殺菌効果が期待できると想定される条件である、菌数を 10 万分の 1 に減数する加熱条件を設定し、検討した評価方法を用いて、加熱による殺

した。

②腸管出血性大腸菌 O157 の 3 株を 60°C で加熱し、加熱による殺菌効果の有効性評価に用いる菌株を選定した。466 株(強毒)、58 株(強毒)、442(stx-)株(弱毒)をそれぞれ LB 液体培地で 37°C、18 時間培養した。5×10⁶ cfu/ml になるように PBS で懸濁し、マイクロテストチューブに入れ、氷中で冷却した。60°C に温度設定したヒートブロック恒温槽に調製した菌液入りのマイクロチューブを入れ、10 分間加熱した。加熱時間 0 から 1 分ごとに菌液を一部回収し、氷冷した PBS 中に懸濁した。回収したサンプルをスパイラルプレーターで LB 寒天培地に塗抹し、出現した集落数を計測した。

③加熱による殺菌効果の有効性を評価する時、試料にどのように熱が伝わり、中心部が 60°C に達するかのデータが必要となる。そこで牛肝臓の内部温度の測定方法について検討をおこなった。まず、牛肝臓の中心部温度を測定するために、加熱時に用いるストマック袋を作製した。厚さ 1mm のゴムシートを 50×50mm に切り分け、中心部にパンチで直径 2mm の穴を開けた。開けた穴を塞ぐようにして接着剤を塗り広げ、ストマック袋 (180mm×300mm) の上部から 5cm 下にゴムシートを貼り合せ、室温で一晩よく固め、牛肝臓の中心部温度を測定するためのストマック袋とした。上記で作製したストマック袋に 25 g の牛レバーを入れ、脱気後、シーリングした (図 3-A)。その後、冷蔵 (4°C) および冷凍 (-30°C) で一晩置いて安定させた。ストマック袋に貼り付けたゴムシートの穴から直径 3mm の温度センサを通し、空気が入らないように牛肝臓の中心部までセンサの先を差し入

れた (図 3-B)。センサを通した牛肝臓入りのストマック袋を 60°C に設定した温浴層に入れ、10 秒毎に 30 分間中心部の温度を記憶計で記録した。また、浴槽内の温度も同時に記録した (図 3-C)。

④腸管出血性大腸菌 O157 を牛肝臓に接種し、加熱により菌数を 10 万分の 1 にする時間について検討した。25 g の牛肝臓に菌液を 10⁸ cfu/g になるように 1ml シリンジ (注射針 25G) を用いて 0.1 ml 接種した。接種した牛肝臓をストマック袋に入れ、脱気した後、シーリングした。シーリング後、冷蔵 (4°C) および冷凍 (-30°C) で一晩置いて検体を安定させた。一晩安定化した検体を 60°C に設定した温浴槽に入れ加熱した。冷蔵検体は、加熱開始 8 分から 20 分まで 2 分ごとに各 3 検体を取り出し、冷凍検体は、加熱開始 14 分から 26 分まで 2 分ごとに取り出した。加熱後、氷中で検体を 30 分間冷却後、検体に 225 ml の BPW を加え、1 分間ストマッキング処理を行った。得られた 10% 乳剤の一部を BPW で希釈し、クロモアガー O157 寒天培地にスパイラルプレーターを用いて塗抹し、集落を計数した。残りの 10% 乳剤は、37°C で 18 時間増菌培養後、一白金耳分を CT-SMAC 寒天培地に画線塗抹し、37°C で 18 時間培養し、各寒天培地上における集落の有無を確認した。加熱における菌数の消長をグラフにし、回帰直線の傾きを計算し、その傾きに従い、冷蔵および冷凍した牛肝臓中の O157 が 10 万分の 1 になる加熱時間を算出した。

⑤加熱による殺菌効果の有効性について①で確立した方法で検討をおこなった。腸管出血性大腸菌 O157 442 株を LB 液体培地で 18 時間培養し、回収した菌体を PBS で

1 回洗浄後、最終菌量 2.5×10^{10} cfu/ml となるように、PBS で懸濁し接種菌液を得た。牛肝臓を 1 検体 25 g になるように 24 個に切り分け、菌接種用を 12 検体、非接種用を 12 検体とした。接種用の牛肝臓に菌液を 10^8 cfu/g になるように 1ml シリンジ（注射針 25G）を用いて中心部 4 箇所（計 0.1 ml）接種した。接種した牛肝臓をストマック袋に入れ、脱気した後、シーリングした。シーリング後、接種/非接種の検体をそれぞれ 6 検体ずつ、冷蔵（4℃）および冷凍（-30℃）で一晩置いて安定させた。一晩安定化した検体をさらに加熱/非加熱の 3 検体に分け、60℃に設定した温浴槽に入れ 10 万分の 1 に菌数が減少するように④で設定した加熱時間である冷蔵検体 19.15 分、冷凍検体 21.37 分加熱した。加熱後、速やかに検体を氷中で 30 分間冷却した。各検体に 225 ml の BPW を加え、1 分間ストマッキング処理を行った。冷凍・非加熱の検体については、室温で 30 分間放置し解凍した後、ストマッキング処理を行った。得られた懸濁液を 10% 乳剤とし、その一部を BPW で希釈後 0.1 ml を標準寒天培地、VRBG 寒天培地、CT-SMAC 寒天培地およびクロモアガー O157 寒天培地にそれぞれスパイラルプレーターで塗抹し、各寒天培地上に出現した集落を計数した。残りの 10% 乳剤は、37℃で 18 時間増菌培養を行い一白金耳分を標準寒天培地、VRBG 寒天培地、CT-SMAC 寒天培地およびクロモアガー O157 寒天培地に画線塗抹し、37℃で 18~24 時間培養し、各寒天培地上における集落の有無を確認した。なお、各寒天培地に生育した典型的な集落が O157 であることは大腸菌 O157 検出キット UNI (OXOID) にて確認

した。

C. 研究結果

①加熱による殺菌効果の有効性を評価する方法を確立した。確立した方法はフロー図として図 1 に示した。検体は、牛肝臓を滅菌した包丁で切り分け、各試料 25 g の中心部に菌を接種する。菌を接種した検体をストマッカー袋に脱気およびシーリングして分包する。分包した検体はさらに、冷蔵と冷凍に分け、それぞれ 4℃および -30℃で一晩置き、温度を安定化する。冷蔵、冷凍検体のうちそれぞれ半分を 60℃の浴槽中で加熱する。加熱および非加熱の検体それぞれに緩衝ペプトン水 (BPW) 225 ml を加え、1 分間ストマッキング処理する。ストマッキング後、得られた 10% 乳剤を、定性試験として、37℃で 18 ± 2 時間、増菌培養する。また、定量試験として、10% 乳剤の一部を BPW で希釈し、スパイラルプレーターを用いて、標準寒天培地、VRBG 寒天培地、CT-SMAC 寒天培地およびクロモアガー O157 寒天培地にそれぞれ塗抹し、37℃で 18~24 時間培養し、集落を計数する。定性試験は、増菌培養液から一白金耳分を取り出し、標準寒天培地、CT-SMAC 寒天培地およびクロモアガー O157 寒天培地に画線塗抹し、37℃で 18~24 時間培養し、集落の有無を確認する。加熱時間は当初 80℃を考えていたが、予備検討において 80℃だと一定の温度に達すると急速に菌が減少し、死滅することが確認された。そのため、加熱条件を緩和し、60℃と設定した。また、放射線殺菌と同じ条件になるように菌数を 10 万分の 1 にするためには、定性試験での検出限界が 1×10^2 cfu/g となる。そのため、

接種菌量は 1×10^7 cfu/g 以上必要であると考えられるので、接種菌数は 1×10^8 cfu/g とした。また、加熱時間の設定は、実際に菌を牛肝臓に接種し、④で加熱時間を検討した。

②加熱による殺菌効果の有効性評価に用いる菌株の選定をおこなった。各菌株の 60°C 加熱における菌数の消長について、0 分を 100% として図 2 に示した。加熱 1 分では 3 株間の生菌数に差は認められなかったが、加熱 2 分では、442 (stx-) 株は、40% 生残したのに対して、466 株および 58 株は 10% であった。466 株および 58 株は加熱 3 分以降、検出限界以下になるのに対して、442 (stx-) 株は加熱 3 分間、4 分間でも 7%、0.06% 生残しており、466 株および 58 株に比べて熱耐性が認められた。

③ 60°C の浴槽中で牛肝臓を加熱し、中心部の温度を計測した結果を図 4-A、B に示す。一晩安定化した冷蔵検体は、 5.8°C で冷凍検体は -10.3°C であった。冷凍検体は凍った状態なので、中心部に熱が伝わるのに時間がかかり、加熱開始 4 分までは、温度上昇の立ち上がりが悪かった。冷蔵検体に比べ 60°C に到達する時間は遅れるが、その後は、冷蔵検体と同じように温度上昇することが確認できた。両検体とも 58°C 前後から温度上昇がゆるやかになり、その温度に到達する時間は、冷蔵検体では 8 分で冷凍検体では 14 分であった。浴槽内の温度は、 60°C で一定していた。この結果を基に、次の④において、実際に牛肝臓に菌を接種し、それぞれこの温度に達した時間から、検体を回収し、菌数をおおよそ 10 万分の 1 にする加熱時間を検討することにした。

④牛肝臓 1 g あたり、おおよそ 1.0×10^8 cfu

の菌を接種し、 60°C で加熱した結果を図 5-A、B に示す。冷蔵および冷凍の両検体とも経時的に菌数が減少していくことが確認された。冷蔵検体について、加熱 8、10、12 分では、3 検体とも菌を回収することができたが、それ以上ではばらつきが大きくなり、14 分では、2 検体から菌が回収されたが残りの 1 検体では、平板培地に 1 集落認められるのみであった (検出限界 $2 \log$ cfu/g)。16 分では、2 検体から菌を回収することができたが、各平板培地に 1 個、2 個の集落を認めるのみであった。18 分、20 分では菌は回収できなかった。増菌培養後、菌は検出されたことより、20 分間の加熱では菌は死滅していないことが明らかとなった。菌の消長グラフから回帰直線の傾きが得られる加熱 8 分から 14 分 (検出限界以下を除いた 2 検体の平均) から菌数をおおよそ 10 万分の 1 にする加熱時間を算出した結果、冷蔵検体は 19.15 分であった。冷凍検体では、加熱 14、16、18、20 分まで 3 検体とも菌を回収することができたが、それ以上ではばらつきが大きくなり、22 分では、2 検体から菌を回収できたが、1 検体では 1 個の集落が認められるのみで、24 分では、1 検体から菌を回収するのみであった。26 分では、菌は回収できなかった。増菌培養後、菌は検出され、26 分間の加熱では菌は死滅していないことが明らかとなった。加熱 16 分から 20 分の回帰直線から菌数をおおよそ 10 万分の 1 にする加熱時間を算出すると 21.37 分であった。

⑤加熱による殺菌効果の有効性を検討した結果を表 1-A、B に示す。非接種および非加熱の冷蔵で一晩安定した検体の一般生菌数は、 $2.48 \sim 3.36 \log$ cfu/g で、冷凍の場合

は、2.00~2.60 log cfu/g であり、一般生菌は冷凍により減数することが確認された。O157 接種の冷蔵検体の菌数は 7.57~7.74 log cfu/g で、冷凍検体は 7.64~7.85 log cfu/g であった。冷蔵、冷凍間で差がなく、また、それぞれ標準寒天培地と選択分離培地において生育に差は認められなかった。標準寒天培地で生育し、選択分離培地で生育できない場合を損傷菌とした場合、24 時間の凍結で本菌株は損傷を示さないことが認められた。接種および加熱において、冷蔵検体は、いずれの検体からも菌を回収することができなかったが、(表 1-A 中、検出された 1 検体は非定型で O157 ではなかった) 増菌培養後、すべての検体から O157 を回収することができ、19.15 分間加熱で菌がすべて死滅した訳ではないことが示された。冷凍検体では、クロモアガー O157 寒天培地で 2 検体から菌が回収でき、3.56、4.30 log cfu/g であった。残りの 1 検体から菌は検出限界以下であったが、増菌培養後は菌を回収できた。検体間に大きなばらつきが認められるが、おおよそ 10 万分の 1 の菌の減数が確認できた。CT-SMAC 寒天培地では、2.30~4.85 log cfu/g 回収され、VRBG 寒天培地では、4.42~5.73 log cfu/g、標準寒天培地では、4.72~5.84 log cfu/g 回収された。選択分離培地である CT-SMAC 寒天培地およびクロモアガー O157 寒天培地で生育できる菌数が標準寒天培地で生育できる菌数よりも少ないことより、接種菌株は熱損傷を受けたと考えられる。また、損傷菌の検出は、クロモアガー O157 寒天培地よりも CT-SMAC 寒天培地の方が優れていた。標準寒天培地と VRBG 寒天培地間では検出に差は認められなかった。加熱損傷における

O157 の検出には、選択分離培地によって検出率が異なることが示された。

D. 考察

①今回確立した方法は、検体を接種/非接種、冷蔵/冷凍、さらに、加熱/非加熱に設定し、選択分離培地を用いることから、牛肝臓の夾雑菌量や保存時の O157 の損傷の程度を評価し、加熱による殺菌効果を充分検証できる方法であると考えられる。実際、確立した方法での加熱による殺菌効果の有効性は、⑤で評価した。

②加熱後 1 分で生残数に差が認められなかったのは、菌が入ったチューブ全体に熱が充分伝わっていなかったためと考えられる。それ以降は熱が伝導し、生残性に差が表れたと考えられる。腸管出血性大腸菌は、感染に必要な菌数が 100 以下と少ないのが特徴で、取り扱いには注意が必要である。stx 遺伝子を保持しない弱毒性の 442 (stx-) 株が他の株に比べ、熱抵抗性を示したことは、加熱による殺菌効果の有効性を評価するのに有用であり取り扱い従事者にとっても安全性が確保できるものと考えられ、以降の検討には 442 株を用いることとした。

③ストマック袋にセンサの直径よりも小さい穴を開けたゴムシートを接着剤で張り付け、その穴からセンサを通すことにより、検体とストマック袋に空気や水を入れることなく、牛肝臓の中心部の温度を正確に測定することができた。本方法を用いれば、たとえ試料の種類や大きさを変えても加熱時の温度変化を正確にモニターすることができると思われる。

④牛肝臓 25g に O157 を接種し、検体をストマック袋に入れ脱気後、加熱を行った。

検体内の温度が最初から 60℃ではなく、徐々に熱が検体に伝わる方法であることから、厳密に菌数が 10 万分の 1 になる 5D 値を設定することは困難であるので、おおよそ 10 万分の 1 に減数できる時間として設定した。この場合、冷蔵検体の加熱時間を 19.15 分と算出したが、図 5-A において、加熱時間 18 分を超えると検出限界以下になっている。これは、加熱により菌数は図 5-B の冷凍検体と同様に減っていくと考えられるが、加熱時間 12 分、14 分における減数の傾きが小さく、その後の計算に影響を与えてしまったと考えられる。しかしながら、検体間でばらつきが大きく、加熱 20 分においても菌は死滅していないことを考慮し、ここで求めた理論値である冷蔵検体 19.15 分、冷凍検体 21.37 分を、菌数を 10 万分の 1 にする加熱時間とし、⑤において加熱による殺菌効果の有効性を検討することとした。

⑤加熱による殺菌効果の有効性の検討した結果、接種および加熱における冷蔵検体ですべて検出限界以下になっていたのは、冷蔵検体の加熱時間の設定が長かったためと考えられる。菌の凍結損傷が認められないことから、やはり、検討④において冷蔵検体と冷凍検体は同じように菌が減少して行くと考えられることより、図 5-A に示した加熱 12 分と 14 分の減数の傾きが小さいのが、その後の加熱時間の設定に影響を与えたものと考えられる。接種および加熱における冷蔵検体は、クロモアガー O157 寒天培地でおおよそ 10 万分の 1 に減数していたが、その他の培地では検出率が高かった。これは、加熱時間の設定時は、クロモアガー O157 寒天培地であったため、それよりも検

出率の良い培地では菌数が多かった。今回、加熱による殺菌効果の有効性を検証することができたが、もし、増菌培養を行わず、加熱損傷 O157 を検出するには、最適な選択分離培地を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

牛肝臓に対する加熱による殺菌効果の有効性を評価する方法を確立した。この方法は、放射線殺菌の効果の評価する方法として利用可能と思われる。また、評価に有用な O157 の菌株を選定し、加熱による試料の中心部の温度を計測する方法についても検討した。腸管出血性大腸菌 O157 を牛肝臓に接種し、加熱による殺菌効果の有効性を検証した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 山本茂貴、春日文字、五十君静信、岡田由美子、百瀬愛佳、朝倉宏。生食用食肉の規格基準の考え方。日本食品微生物学会雑誌。29:98-100 (2012)
2. 五十君静信。標準試験法の検討と生食用食肉の規格基準への採用。月刊フードケミカル 12月号。332:61-64 (2012)

学会発表なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他
なし

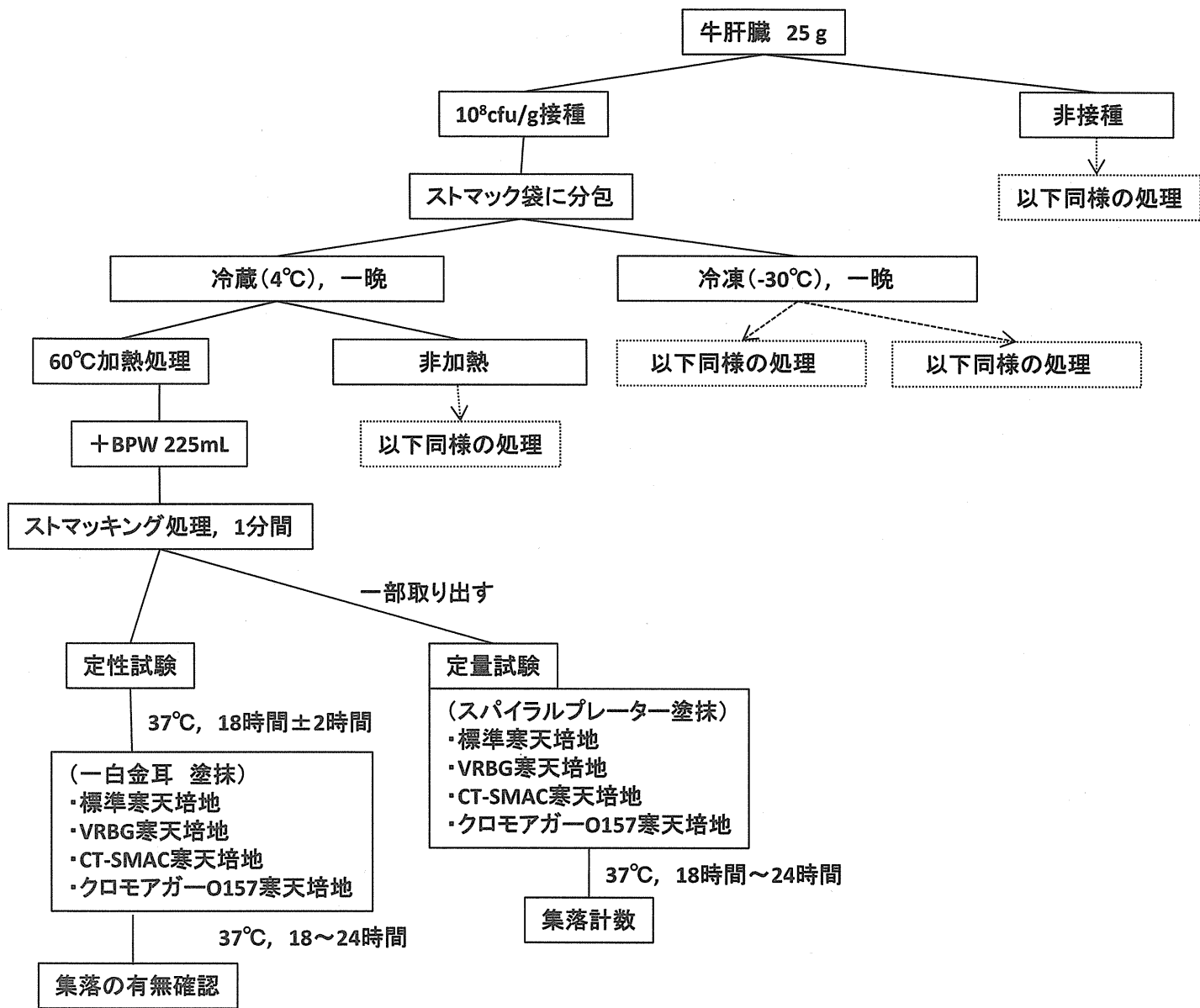


図1 牛肝臓に対する加熱による腸管出血性大腸菌O157の殺菌効果の評価方法の確立

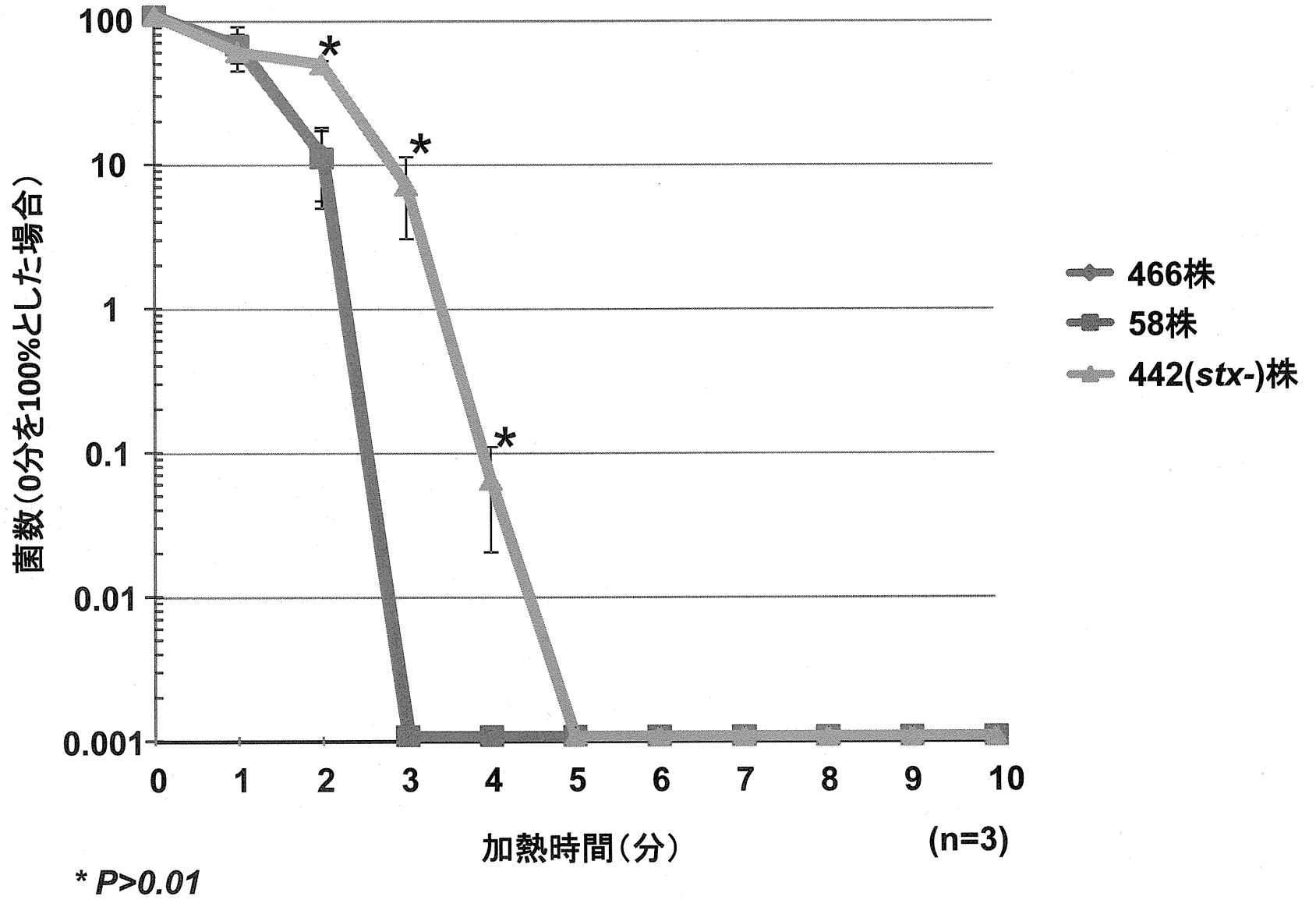


図2 60°C加熱における菌数の消長