

ンス異性化が認められ、トランス酸含量は僅かに増加した。

照射による肝臓の臭気変化について、検討し、ベンジルメルカプタン、フェニエチルアルコール、スカトールが関与している可能性を見出した。

#### E. 文献

- 1) 厚生労働省、薬事・食品衛生審議会、食品衛生分科会 2012年6月12日、  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002fsbi.html>
- 2) 日本油化学会編、基準油脂分析試験法(2013年度版) 2.4.4.3-2013 トランス脂肪酸含量(キャピラリークロマトグラフ法)
- 3) Kitagawa, Y., *et al.*, A Rapid and Simple Method for the Determination of 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Meat and Processed Foods. *Food Analytical Methods in press*. DOI 10.1007/s12161-013-9714-5
- 4) WHO、Diet、Nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO Technical Report Series (No.916)、2003.  
(WHO(2003) 食事、栄養、慢性疾患予防に関する WHO/FAO 合同専門家会合報告書 )  
<http://www.who.int/nutrition/topics/dietnutritionandchronicdiseases/en/>
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長、放射線照射された食品の検知法について(食安発第0706001号、平成19年7月6日、最終改正平成24年9月10日)

6) A. Li *et al.*, Formation of trans fatty acids induced by radicals in irradiated ground beef and liquid egg. *J Am.Oil Chem* , 89 , 2207-2213(2012).

7) M. Driffield *et. al.*, Methods of analysis for 2-dodecylcyclobutanone and studies to support its role as a unique marker of food irradiation *Food Chem* 146、308–3131 (2014) .

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 川崎 晋、持田 麻里、等々力 節子、五十君 静信、牛肝臓中における腸管出血性大腸菌のガンマ線照射による殺菌効果、日本食品衛生学会第106回学術講演会
  2. 等々力 節子、都築 和香子、亀谷 宏美、齋藤 希巳江、川崎 晋、五十君 静信、牛肝臓のガンマ線照射による品質変化、日本食品衛生学会第106回学術講演会 講演・研修会等
- なし

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表1. 牛挽肉・肝臓に接種した*E. coli* O157 DT66株の  
 $\gamma$ 線照射による殺菌効果

照射条件	D値(kGy)			
	氷冷(0°C)		凍結(-80°C)	
	含気	真空	含気	真空
挽肉	0.33	0.35	0.69	0.75
牛肝臓	0.36	0.38	0.80	0.96

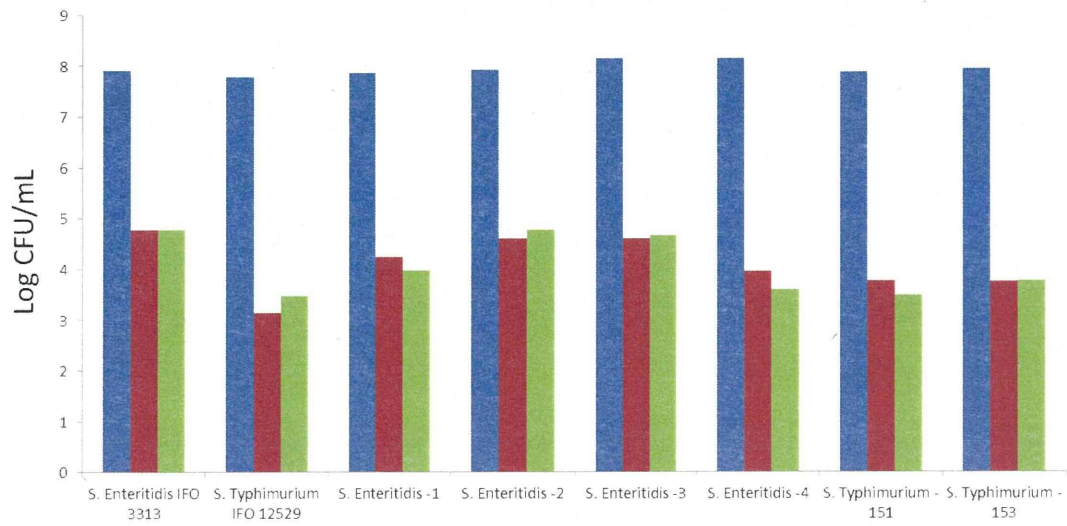


図1. サルモネラのγ線感受性試験結果.

■ ; コントロール, ■ ; 1kGy照射後の菌数 (PCA), ■ ; 1kGy照射後の菌数 (VRBG)

表2. 牛挽肉・肝臓に接種したS. Enteritidis IFO3313株の  
γ線照射による殺菌効果

照射条件	D値 (kGy)			
	氷冷 (0°C)		凍結 (-80°C)	
	含気	真空	含気	真空
挽肉	0.58	0.59	1.00	0.98
牛肝臓	0.62	0.63	1.33	1.21

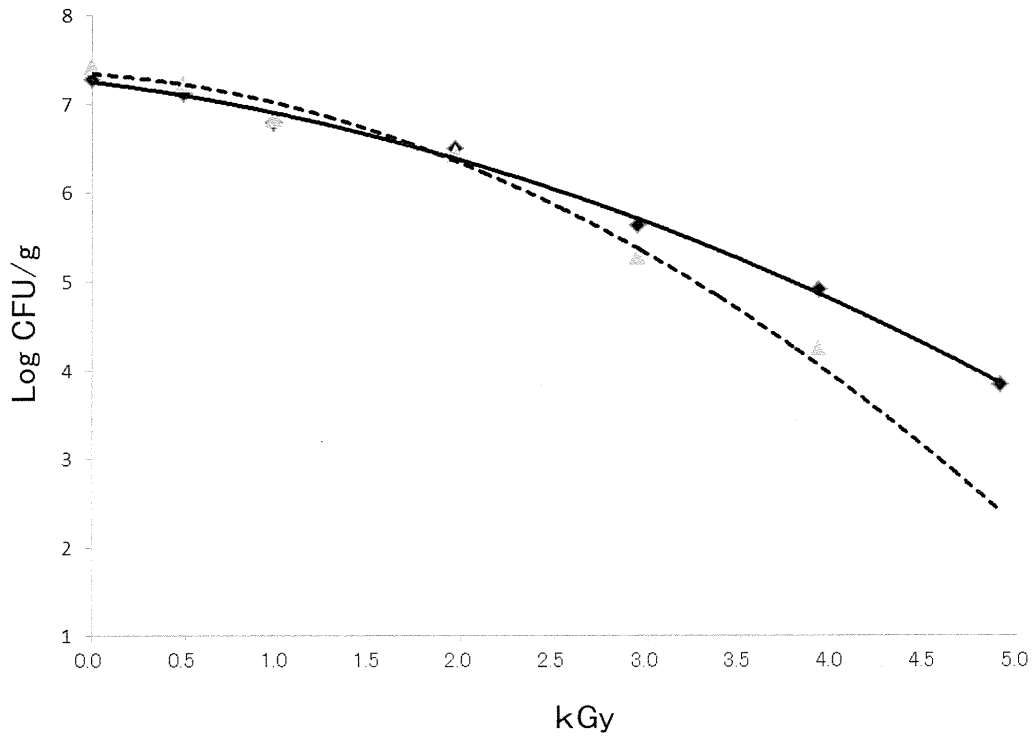


図2. *S. Enteritidis*の $\gamma$ 線生残曲線. (-80°C, 含気包装)

実線は牛肝臓, 破線は牛挽肉での生残を示す.

表 3 照射牛肝臓の主な脂肪酸含量

g/100g

lipid

	control			3kGy (0°C)			5kGy (-80°C)		
14:0	0.33	±	0.01 (0.5)	0.33	±	0.03 (0.5)	0.40	±	0.07 (0.6)
15:0	0.52	±	0.02 (0.8)	0.46	±	0.05 (0.8)	0.45	±	0.03 (0.7)
16:0	7.89	±	0.19 (12.6)	7.93	±	0.69 (13.1)	8.85	±	1.02 (13.9)
16:1 (9c)	0.82	±	0.02 (1.3)	0.80	±	0.05 (1.3)	0.90	±	0.06 (1.4)
17:0	0.43	±	0.00 (0.7)	0.44	±	0.03 (0.7)	0.46	±	0.05 (0.7)
17:1 9c	0.32	±	0.01 (0.5)	0.32	±	0.04 (0.5)	0.35	±	0.02 (0.6)
18:0	15.0	±	0.4 (24.0)	14.9	±	0.3 (24.6)	14.9	±	0.3 (23.4)
18:1 (10t+11t)	0.47	±	0.01 (0.7)	0.47	±	0.01 (0.8)	0.49	±	0.01 (0.8)
18:1 (9c)	11.2	±	0.4 (17.9)	10.6	±	0.1 (17.5)	11.7	±	0.3 (18.4)
18:1 (11c)	1.02	±	0.03 (1.6)	1.05	±	0.06 (1.7)	1.07	±	0.06 (1.7)
18:2 (9c、 12c)	9.88	±	0.20 (15.8)	9.64	±	0.09 (15.9)	9.71	±	0.69 (15.2)
18:3	0.30	±	0.01 (0.5)	0.30	±	0.01 (0.5)	0.31	±	0.02 (0.5)
21:0	0.29	±	0.01 (0.5)	0.29	±	0.01 (0.5)	0.31	±	0.00 (0.5)
20:3	2.78	±	0.09 (4.5)	2.69	±	0.04 (4.4)	2.57	±	0.22 (4.0)
20:4	5.12	±	0.10 (8.2)	4.98	±	0.05 (8.2)	4.82	±	0.40 (7.6)
22:4	1.26	±	0.03 (2.0)	1.23	±	0.01 (2.0)	1.18	±	0.10 (1.9)
22:5	0.79	±	0.02 (1.3)	0.76	±	0.01 (1.3)	0.74	±	0.06 (1.2)
22:6	0.15	±	0.01 (0.2)	0.14	±	0.01 (0.2)	0.14	±	0.00 (0.2)
others	3.84	±	0.16 (6.2)	3.90	±	0.02 (6.4)	4.05	±	0.06 (6.4)
total	62.39	±	1.75 (100.0)	60.48	±	0.52 (100.0)	63.66	±	1.18 (100.0)

\*mean values ± SD (n=3) (Weight %)

表 4 照射牛肝臓の脂肪酸含量のまとめ (トランス型不飽和脂肪酸)

g/100g

lipid

	control	3 kGy (0°C)	5 kGy (-80°C)
総飽和脂肪酸	25.0 ± 0.6	25.0 ± 1.1	26.0 ± 1.0
シス型モノエン酸	14.2 ± 0.4	13.6 ± 0.2	15.0 ± 0.3
シス型ポリエン酸	21.1 ± 0.5	20.5 ± 0.2	20.2 ± 1.5
総シス型不飽和脂肪酸	35.3 ± 0.9	35.4 ± 2.2	36.0 ± 2.2
トランス型モノエン酸	1.37 ± 0.05	1.40 ± 0.03	1.43 ± 0.03
トランス型ポリ塩酸	0.19 ± 0.02	0.25 ± 0.01 *	0.22 ± 0.01
総トランス型不飽和脂肪酸	1.56 ± 0.04	1.65 ± 0.03 *	1.65 ± 0.03 *
<i>trans</i> 18:1	1.11 ± 0.03	1.14 ± 0.03	1.16 ± 0.03
<i>trans</i> 18:2	0.18 ± 0.02	0.23 ± 0.02 *	0.20 ± 0.01
<i>trans</i> 18:3	0.013 ± 0.00	0.020 ± 0.01	0.017 ± 0.01
C18 総トランス型不飽和脂肪酸	1.30 ± 0.03	1.39 ± 0.02 **	1.38 ± 0.04 *

mean values ± SD (n=3)

Statistically significance were determined by t test compared with the control values

(\*; p < 0.05、 \*\*; p < 0.01)

表 5 照射牛肝臓中の2-アルキルシクロブタノン含量

	ng/g F.W.	
	2-dDCB	2-tDCB
コントロール	N.D.	N.D.
3 kGy(0°C)	3.5 ± 0.3	7.7 ± 0.8
5 kGy (-80°C)	4.6 ± 0.4	9.8 ± 0.7

mean values ± SD (n=3)

N.D., not detected



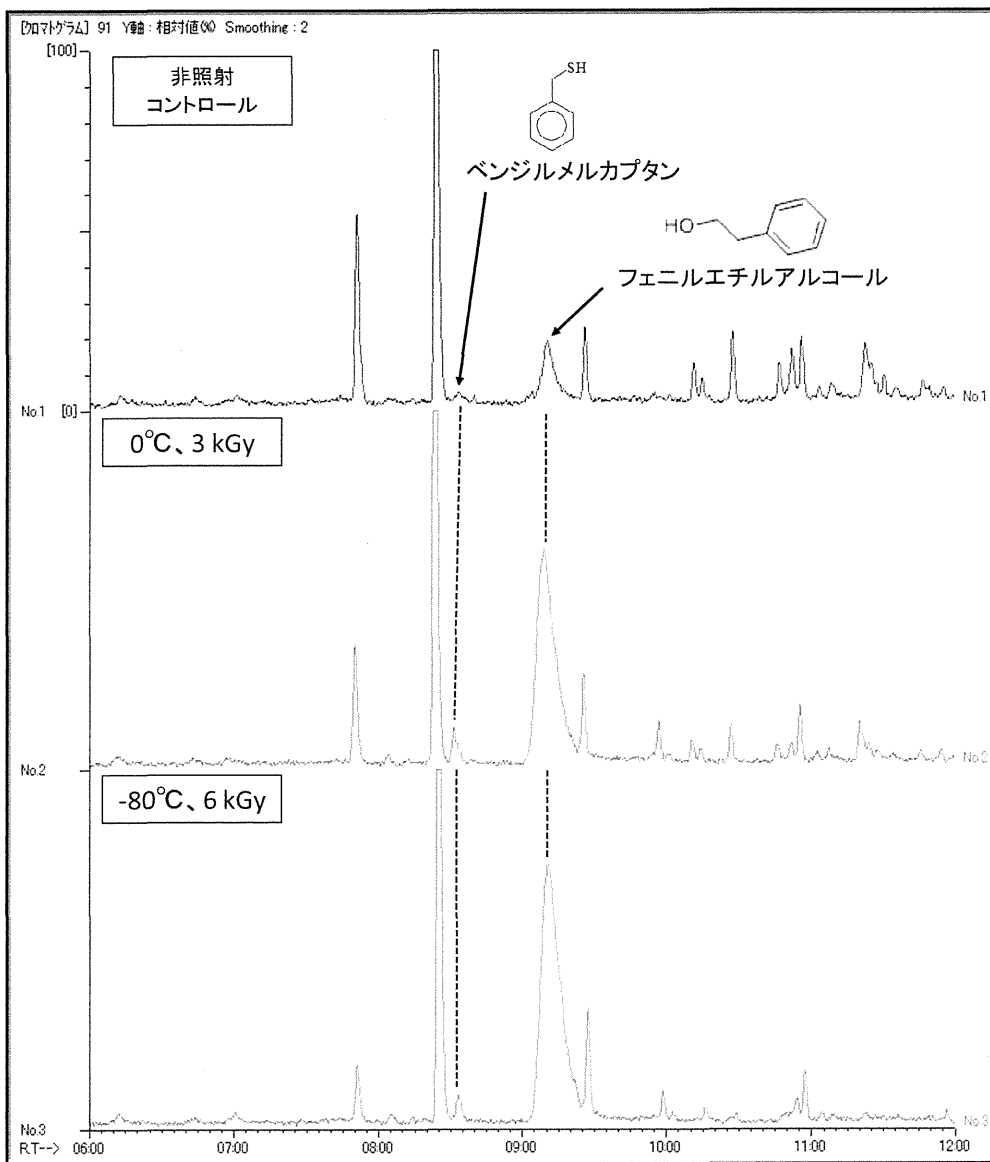


図 3. 抽出臭気成分の GC-MS 分析結果 (m/z 91 のマスクロマトグラム)

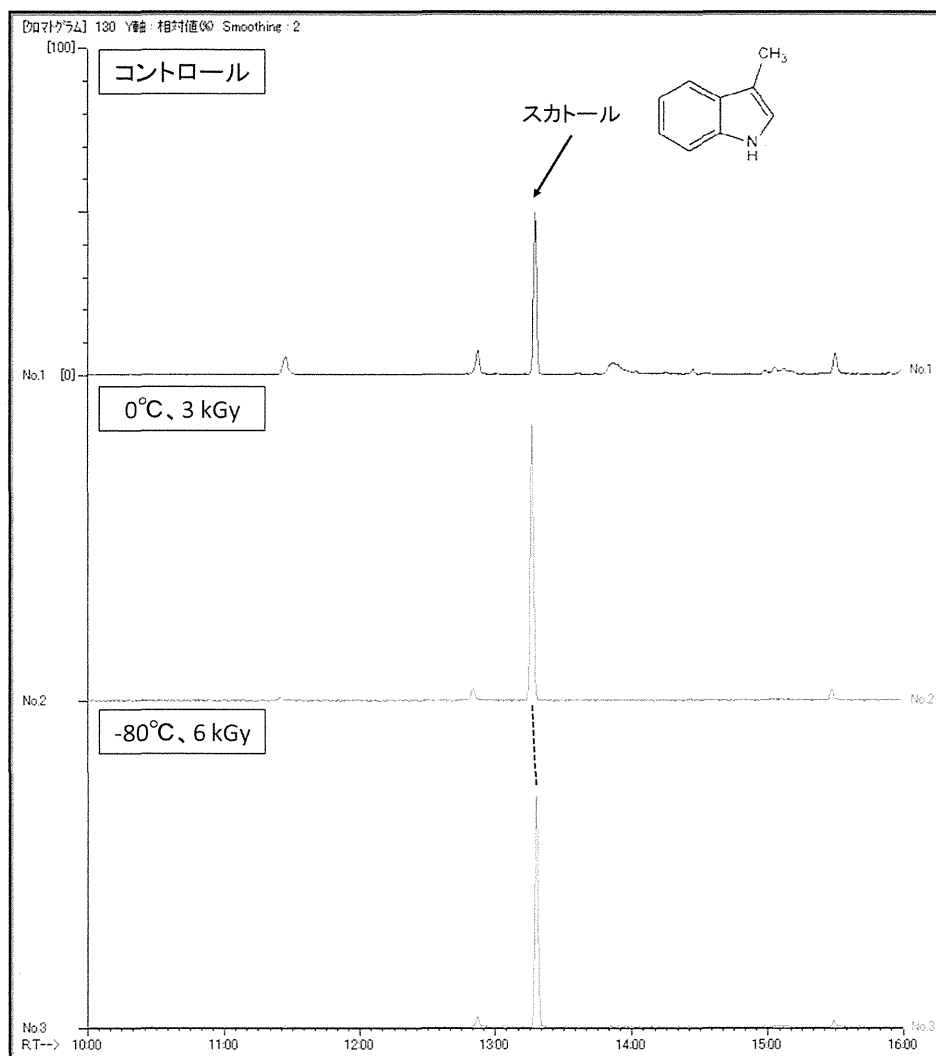


図 4. 抽出臭気成分の GC-MS 分析結果 (m/z 130 のマスクロマトグラム)

平成 25 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業  
畜産食品の安全性確保に関する研究

分担研究報告書

分担研究課題名 牛肝臓内の大腸菌の分布とその殺菌法の検討

研究分担者：山崎 伸二 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

研究協力者：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：牛胆汁および牛肝臓内の大腸菌群の分布の相関性について調べたところ、相関性のある場合とない場合があることがわかった。牛肝臓内での細菌汚染の部位を明らかにするため組織化学的に調べた結果、多くの場合胆管内に細菌が検出されたが、類洞においても細菌が検出された。しかしながら、汚染部位周辺にマクロファージの集積や炎症が見られなかったことから、牛の屠畜解体後なんらかの理由で肝臓内に細菌が汚染した可能性が考えられた。牛の各種消化管部位における STEC 汚染を調べることを目的に、*stx* 遺伝子を検出したところ、盲腸で 50%、肛門では 100% 検出された。一方、牛肝臓内に O157 を注入し、塩素系消毒薬と凍結融解処理を行なったところ、O157 を約  $10^4$  分の 1 に減らすことができたが個体によるばらつきが見られ更なる検討が必要であると考えられた。

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、牛肝臓内の殺菌法の開発を目的とし、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、牛の消化管内組織のどの部位に STEC が生息しているか、牛肝臓内に細菌が検出されるとすればどの部位か、そして牛

肝臓内に注入した O157 の塩素系消毒薬と凍結融解法を組み合わせた殺菌効果を検討した。

B. 研究方法

1. 胆汁と肝臓内の大腸菌群数

屠畜解体直後に牛肝臓と胆汁を採取し直ちに研究室に持ち込み実験に供した。肝臓約 50 g を同量の滅菌 PBS に加え、ストマッカー処理を 30 秒間行なった。処理が不十分場合は、さらに 30 秒間処理を行なった。ストマッカー処理した肝臓検体 100  $\mu$  L と胆汁 100  $\mu$  L をそれぞれ滅菌 PBS で  $10^8$  倍まで 10 倍段階希釈し、マッコンキー寒天培地に植菌し、37°C、18 時

間培養し、コロニー数を測定し細菌数を算出した。

## 2. 組織化学的解析による牛肝臓内の細菌汚染部位の同定

牛肝臓を約 10 g を切り出し、直ちに中性の 10%ホルマリン溶液に浸漬させた。プロセッサを用いて組織を固定化し、パラフィンで包埋後、マイクロームカッターで厚さ約 3  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色後、顕微鏡にて細菌汚染を同定した。

## 3. 牛消化管内における *stx* 遺伝子の検出

屠畜解体直後に採取した舌、第一胃内容物、十二指腸、十二指腸内容物、盲腸、盲腸内容物、肛門、肛門内容物、胆嚢をそれぞれ約 10 g、肝臓を 50 g を同量の滅菌 PBS に加え、ストマッカー処理を 30 秒間行なった。処理が不十分場合は、さらに 30 秒間処理を行なった。処理後 1 mL を 1.25 倍の TSB 4 mL に加え 37°C、18 時間、浸透培養した。唾液と胆汁についてもそれぞれ 1 mL を同様に培養した。増菌後、培養液を 50  $\mu\text{L}$  を 450  $\mu\text{L}$  の滅菌 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) に加え、100°C、10 分間の加熱処理後、10,000 g、5 分間の遠心分離を行い、得られた上清を PCR 用の鋳型 DNA とした。

*stx* 遺伝子検出用の PCR 法は A. Pal らの方法に準じて行った (Indian J. Med. Res., 110: 83-85, 1999)。得られた PCR 産物は 3%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV 照射下で特異的な遺伝子の増幅を確認した。

## 4. 左胆管を通じて人工的に注入した O157 の塩素系消毒薬と凍結融解による殺菌法の検討

### 4-1. 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  $\mu\text{L}$  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。

### 4-2. 牛肝臓内に注入した O157 の殺菌

先に調整した菌液 (約  $10^6$  から  $10^7$  cfu/mL) 50 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、2,000 ppm の塩素系消毒薬、約 500 mL を注入し胆管内を洗浄した。その後、約 50 g の肝臓を無菌的に切り出し、液体窒素で急速冷凍後、-30°C で約 24 時間放置した。凍結した肝臓を氷水に浸し融解後、肝臓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、希釈液をセフィキムとテルライトを含むソルビトールマッコッキー (CT-SMAC) 寒天培地に植菌し O157 の菌数を調べた。

## C. 研究結果

### 1. 胆汁と肝臓内の大腸菌群数

胆汁と肝臓内の細菌数についてそれぞれ 29 検体について調べた。表 1 に示した

ように、24 検体の胆汁から大腸菌群は検出されなかったが、2 検体で  $10^1 \sim 10^2$  CFU/g、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$  CFU /g がそれぞれ 1 検体で検出された。一方、肝臓内の菌数については、胆汁から検出されなかった 9 検体については肝臓からも検出されなかったが、胆汁から検出されなかった 15 検体と同じ個体の牛の肝臓から  $10^1 \sim 10^6$  CFU /g の細菌が検出された。胆汁で細菌が検出された 5 検体と同じ個体の肝臓からも  $10^3 \sim 10^6$  CFU /g の細菌が検出された。以上の結果より胆汁内と肝臓内の細菌数について相関性が見られる場合と見られない場合があることが明らかとなった。

## 2. 牛肝臓内の細菌汚染部位の同定

牛肝臓内から大腸菌群が検出されたことから、肝臓内における細菌の汚染部位を調べた。27 検体の肝臓を調べた結果、4 検体から胆管内に、8 検体で類洞内に細菌が検出された。胆管内に検出された 1 例を図 1 に、類洞内に検出された 1 例を図 2 に示した。しかしながら、類洞内に細菌が検出された場合、図 1、図 2 に示した 3、4、5 番の通常廃棄される部位がほとんどであるが、まれに 1、2 の可食部位からも検出された。しかしながら細菌が検出された周辺部位にマクロファージの集積や炎症が認められなかったことから屠畜解体後に何らかの理由で肝臓内が汚染された可能性が考えられた。

## 3. 牛消化管内における *stx* 遺伝子の検出

牛消化管内における STEC の分布を調べることを目的に、表 2 に示した各種消

化管部位を 8 個体からそれぞれ 1 検体採取し、*stx1* と *stx2* 遺伝子を PCR 法で検出した。表 2 に示したように、*stx1* 遺伝子はほとんど検出されず、検出されたそのほとんどは *stx2* 遺伝子であった。唾液で 3 検体検出されたが、検出されたそのほとんどは盲腸と肛門であり、肛門では 100%であった。一方、胆汁で 1 検体陽性となったが、同様に肝臓、十二指腸でも陽性となった。

尚、胆嚢については 4 検体について調べたが *stx1*、*stx2* 遺伝子とも全てで陰性であった。

## 4. 牛肝臓内の O157 の塩素系消毒薬と凍結融解による殺菌

O157 を人工的に注入した牛肝臓を塩素系消毒薬、急速冷凍、チルド融解処理を行った。未処理の場合、菌数は  $10^4 \sim 10^5$  CFU /g であったが、処理を行った場合、数 CFU /g～数 10 CFU /g まで減少した。しかしながら、数 10 CFU /g～数 100 CFU /g までしか減少しない場合もあり、個体間のばらつきがあった。

## D. 考察

健康な牛の肝臓内に細菌が検出されることはなく、牛肝臓内の O157 汚染は牛をと殺す際、胆汁の逆流によることが原因となる可能性を考え、胆汁内と肝臓内の細菌数の相関性について調べた。その結果、相関性のある場合とない場合があることがわかった。この原因を明らかにすることを目的に、牛肝臓内の細菌汚染について組織化学的に検討した。その結果、肝臓内の細菌汚染は胆管内と類洞

内の2種類あることがわかった。両者とも細菌が検出された周辺部位にマクロファージの集積や炎症が認められないことから、当初の作業仮説である牛の肝臓内の O157 汚染は胆管が原因となっている可能性ともう1つ別の可能性があると考えられた。もう1つの可能性として、類洞内に検出されたことから屠畜解体後に門脈を通じて細菌が侵入し汚染した可能性が考えられた。

一方、牛消化管内での STEC の汚染部位や肝臓への汚染ルートを明らかにすることを目的に *stx* 遺伝子を PCR で検出した。その結果、肛門での汚染率は 100%、唾液での汚染率も約 40%と他の部位に比べて高く、牛が排泄した便を牛が再び口から摂取して汚染が起こっている可能性が考えられた。さらに、1例で胆汁、十二指腸、肝臓で *stx2* 遺伝子が検出され、肝臓内の STEC 汚染は十二指腸から胆汁を通じて肝臓内へ菌が侵入した可能性が考えられた。しかしながら、例数が少ないことから今後さらに例数を増やして検証して行く必要がある。汚染経路が明確でないため、STEC に汚染されていない安全な食肉、特に肝臓を提供するためには肝臓内に汚染している可能性がある STEC を何らかの方法で殺菌する必要がある。

我々は、塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせることで相乗的に殺菌効果が高まることを見だし、塩素系消毒薬の注入速度、条件、凍結温度、解凍条件等様々な条件検討を行ってきた。しかし、今回の結果で示したように、我々が用いている塩素系消毒薬と凍結融解を組み合

わせた方法はほぼ  $10^4$  分の 1 に菌数を減らすことができるものの個体により得られる結果にばらつきがあり、更なる改良の余地がある。

今回行った実験では、検体数が十分でなく、今後さらに検体数を増やして調べて行く必要がある。

## E. 結論

牛肝臓内の細菌汚染は、胆管を介する経路と胆管以外の経路がある可能性が示された。肝臓内での細菌の汚染部位は、胆管内と類洞内であり、炎症反応惹起していないことから、肝臓内の細菌汚染はおそらく門脈を介して起こっている可能性考えられる。

*stx* 遺伝子の検出結果では、肝臓内の STEC 汚染は、十二指腸から胆管を通じた逆流である可能性が考えられた。肝臓内の O157 の殺菌法として塩素系消毒薬や有効である一方、個体間のばらつきの問題があり今後更なる検討が必要である。

## F. 健康危機情報

一部の牛肝臓に、屠畜解体時の胆嚢からの胆汁の逆流と門脈経由の汚染によると思われる牛肝臓の細菌汚染が認められた。一部の肝臓では PCR 法で *stx2* 遺伝子が検出されたことから、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

無し

## H. 知的財産権の出願、登録状況

無し

表 1. 胆汁内と肝臓内菌数の相関性

検体数 (n=29)	胆汁内菌数 (CFU /g)	肝臓内菌数 (CFU /g)
9	10 <sup>&gt;</sup>	10 <sup>&gt;</sup>
10	10 <sup>&gt;</sup>	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>
4	10 <sup>&gt;</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>
1	10 <sup>&gt;</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>
2	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
1	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
1	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>
1	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>

表 2. 牛の様々な消化管部位における *stx* 遺伝子の分布

採取部位 (検体数)	<i>stx1</i> 遺伝子陽性 数	<i>stx2</i> 遺伝子陽性 数
舌 (8)	0	1
唾液 (8)	2	3
胆汁 (8)	0	1
肝臓 (8)	0	1
第一胃内容物 (8)	0	1
十二指腸 (8)	0	1
十二指腸内容物 (8)	0	1
盲腸 (8)	1	4
盲腸内容物 (8)	0	2
肛門 (8)	2	8
肛門内容物 (8)	1	7
胆嚢 (4)	0	0



協力研究報告書

高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する検討

研究協力者 荻原 博和 日本大学生物資源科学部  
研究協力者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所  
研究協力者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：牛肝臓中の食中毒菌に対し加熱によらない殺菌処理を行う目的で、静水圧を利用した高圧処理を実施し、人工的に牛肝臓に汚染させた大腸菌の不活化効果を検討した。その結果、予備検討である菌懸濁液を用いた殺菌試験では、400MPa・10min 処理で 5 D の殺菌効果が得られた。大腸菌を接種した肝臓を用いた殺菌試験では、500MPa・10min 処理で 5 D の殺菌効果が得られ、有効な不活化効果が認められた。しかしながら、肝臓の色彩と硬度に大きな変化がみられたため、十分な殺菌効果が得られ、尚且つ品質変化の少ない高圧処理条件の検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

食品や食材の殺菌には、一般的に加熱処理が行われており、食品の安全性に貢献している。一方で食材は加熱による処理を行うと、その性状や外観が変性することが知られている。これに対して加熱処理を伴わない、非加熱処理については化学的処理と物理的処理技術があり、代表的な処理技術は放射線、高電圧パルス、パルス光、高圧殺菌処置技術等が知られている。そのなかでも静水圧を利用した高圧処理は、1980 年代に日本において林氏が、約 100 MPa 以上の圧力を食品加工に利用する事を提唱して以来、高圧におけるさまざまな研究や高圧処理食品が開発されるようになった。高圧加工は加熱処理を施さないために、加熱による変性が少なく、比較的生の食材の香り、色、風味が保たれた品質の食品が製造可能である。また、高圧処理により微生物が死滅するので、高圧力による微生物の不活性化も可能である。

生肝臓は病原菌に汚染している可能性が高いことから、生食するためにはこれらの病原菌、特に腸管出血性大腸菌の殺菌や除菌処理が必要となってくる。そのため生の食感をできるだけ残しつつ、これらの病原菌の殺菌を行い、病原菌による感染リスクの低減を図る必要がある。そこで非加熱殺菌処理の一つとして存在する高圧処理による生肝臓の *E. coli* の不活化効果の検討を行った。

B. 研究方法

(1) 試料

牛の生肝臓（レバー）は市販の販売店および芝浦屠場より入手した。

(2) 供試菌株

実験に供した菌株は *Escherichia coli* O157:H7 を想定して、代表的な *Escherichia coli* ATCC25922 を用いた。  
-80℃に保存してある菌株を取り出し、TSB

培地を用いて 37°C で 2 代継代培養したものを実験に供した。

### (3) 高圧処理からの *E. coli* の検出及び測定法

リン酸緩衝液からの菌数の計測は、非選択培地である PCA 培地を用いて混釈し、37°C で 24 時間培養し、発育した集落を計測した。

食品検体からの大腸菌の検出は、PCA 培地および大腸菌群及び大腸菌の検出培地である日水製薬社製の酵素基質培地である XMG 培地を用いて、37°C で 24 時間培養し、発育した青色集落を大腸菌として計測した。

### (4) 高圧処理装置と処理方法

高圧処理装置は、高圧ポンプ、ヨークフレーム、圧力装置、制御盤から構成される加圧装置と恒温循環装置からなるスギノマシン社製を (HPV-80C20-S) を用いた。

加圧容器は間接加圧方式で高圧処理上限は 500MPa、加圧媒体は精製水で処理を行った。

### (5) リン酸緩衝液に懸濁した *E. coli* の高圧処理による不活化効果の検討

リン酸緩衝液に懸濁した *E. coli* をアンプルに充填し、これらを高圧処理装置に設置し、200, 300, 400, 500MPa の圧力で、それぞれ 10, 20, 30 分間の高圧処理を行った。各処理液は PCA 培地を用いて残存菌数を計測した。

### (6) 高圧処理による肝臓中の *E. coli* の不活化効果とその外観の検討

牛の肝臓を (横 2cm × 縦 3cm, 厚さ 0.5cm 程度で重量 10g 程度) 長方形のブロックにカットしたものを作製した。接種用の *E. coli* を均等に肝臓ブロックの 10 カ所に 合計 100  $\mu$ l 接種した。これらをプラスチック

バックに入れ、シーラーでシールを行った。さらにプラスチックバックに挿入して、二重の状態にして高圧処理試料を作製した。

これらを高圧処理装置に設置し、次の処理圧力 200, 300, 400, 500MPa で 10 分間の高圧処理を行った。処理後、*E. coli* の検出測定には、PCA 培地による生残菌数の計測と *E. coli* の選択培地である XMG 培地を用いて発育した青色の集落を *E. coli* として計測した。さらに、処理後の肉色の変化を肉眼と色差計で測定し、肉質の硬さも検討した。

## C. 結果及び考察

### (1) リン酸緩衝液に懸濁した *E. coli* の高圧処理による不活化効果

リン酸緩衝液に懸濁した *E. coli* の高圧処理における結果を Fig. 1 に示した。高圧処理前の未処理での菌数は対数値で 9 log CFU/ml であった。これらの菌液の高圧処理を行うと、高圧処理 200MPa・10 分処理では未処理とほぼ同様の菌数を示し、高圧処理による菌数の減少は認められなかった。さらに高圧処理の時間を延長した 20 分処理では、死滅する現象が観察され、30 分処理で 1 オーダーの減少が認められた。次に高圧処理 300MPa では、200MPa に比べて急激な菌数の減少が観察され、10 分処理で 4.4 log CFU/ml, 20 分処理で 3.3 log CFU/ml, 30 分処理で 2.9 log CFU/ml に減少した。さらに高圧処理 400MPa では 10 分処理で 3.0 log CFU/ml, 20 分処理で 2.6 log CFU/ml, 30 分処理で 2.9 log CFU/ml に減少した。最も圧力の高い 500MPa では、10 分処理で 1.9 log CFU/ml, 20 分処理と 30 分処理では検出限界以下であった。以上の結果、高圧処理により 5 log CFU/ml の有効な殺菌効果が認められた圧力は 400MPa と 500MPa であった。さらに高圧処理時間を延長するにつれて、緩やかでは

あるものの殺菌効果が高まる傾向が認められた。

## (2) 高圧処理による肝臓中の *E. coli* の不活化効果とその外観に及ぼす影響

牛肝臓に接種した *E. coli* の高圧処理による不活化効果を非選択培地の PCA 培地を用いて生残菌数の結果を Fig. 2 に示した。予備実験により高圧処理が *E. coli* に対して有効な死滅効果が認められたことから、牛の肝臓に *E. coli* を接種して高圧処理条件を 200MPa, 300MPa, 400MPa, 500MPa そして処理時間 10 分で行った。その結果、肝臓中の未処理菌数は 7.1 log CFU/g を示した。200MPa 処理ではほとんど菌数の減少が観察されなかった。300MPa から菌数の減少が観察され 1.5 log CFU/g の減少が認められた。さらに 400MPa では 3.0 log CFU/g の減少、最も高い圧力の 500MPa では 5 log CFU/g の菌数減少が認められ、5D 程度の殺菌効果が得られた。実際に有効な 5D 程度の殺菌効果が認められた圧力は 500MPa のみであった。

次に、同様に処理した試料を大腸菌の選択培地である XMG 培地を用いて検出測定した結果を Fig.3 に示した。未処理の接種菌数はやや非選択培地より少ない 6.8 log CFU/g であった。高圧処理 200MPa では菌数の減少は認められなかった。300MPa 以上の圧力から菌数の減少が観察され、300MPa では 1.8 log CFU/g の減少が認められ、400MPa では 3.1 log CFU/g 減少した結果となった。さらに 500MPa では 5.0 log CFU/g と有効な菌数の減少が認められ、5D 程度の殺菌効果が得られた。検出培地である非選択培地の PCA 培地と選択培地の XMG 培地間には顕著な差は観察されなかった。

以上のことから、非選択培地と選択培地による検出結果には、両者の測定法に差がないことから、選択培地に使用される選択剤による損傷菌による影響は少ないものと推察された。

高圧処理による肝臓色の変化を測定した結果を Table1 に示した。肝臓の外観は圧力が高まるにつれて肝臓の色彩は、赤みが減少し肌色に変化する傾向が認められた。色彩色差計では、未処理の肝臓数値は L 値が  $36.7 \pm 1.3$ , a 値が  $6.5 \pm 0.6$ , b 値が  $2.2 \pm 0.3$  を示した。圧力が高くなるにつれて、L 値は 200MPa より数値が増加し、300MPa で  $44.3 \pm 1.1$ , 500MPa で  $50.4 \pm 0.4$  に増加した。a 値では 300MPa に  $10.1 \pm 1.0$  に数値の増加が認められたものの 400MPa と 500MPa では顕著な変化は認められなかった。さらに b 値では 300MPa まで大きな数値の変動は見られなかったものの、500MPa では  $8.0 \pm 0.6$  にまで増加した。

次に高圧処理における肝臓の色と硬さの変化を Table 2 と Fig.4 に示した。肉色は処理前では鮮やかな赤褐色を示したものの、高圧処理 200MPa では赤みが少なくなるものの肝臓色を維持していたが、300MPa 以降、400MPa と 500MPa と圧力が高くなるにつれて、赤みが退色し、白っぽくなり加熱したような色合いとなった。

硬さについては、300MPa 以上で、当初の肝臓の柔らかさではなく、明らかに硬さが認められ、400MPa と 500MPa では弾力も感じられるようになった。特に未処理の肝臓とは肉質がかなり異なっていた。

以上の結果から、*E. coli* に対する効果は 500MPa・10min 処理で、5D の殺菌効果が得られ、有効な不活化効果が認められた。しかし、肝臓の状態は生の状態の色彩とテクスチャーは失われ、別物の感触となった。

#### D. 考察

高圧処理による肝臓中の *E. coli* に対する不活化効果は認められるものの、その食材はかなり変性することが観察された。さらに最終的には腸管出血性大腸菌を用いた殺菌効果の検討も必要であると思われ、加圧処理を導入される場合は不活化データの構築も必要と考えられた。利用には効果的な加圧装置の改良と一貫した処理後の衛生管理の検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

非加熱殺菌処理方法の一つである高圧処理による生肝臓中の *E. coli* の不活化効果の検討を行った結果、500MPa・10min 処理で、5D の殺菌効果が認められた。しかし

ながら、高圧処理により肝臓の赤みが退色し、白っぽくなり加熱したような色調変化と、著しい硬化がみられ、品質が大きく変化していた。品質変化を防ぎ、十分な殺菌効果を示す条件の検討が必要であることが示された。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願，登録状況

なし