

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

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腸内細菌科細菌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經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. 胆汁と肝臓内の腸内細菌科細菌数
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 μ L と胆汁 100 μ 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% の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、マイクロトームカッターで厚さ約 3 μm 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 μL を 450 μL 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 μL 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、希釈液をセフィキシムとテルライトを含むソルビトールマッコスキー (CT-SMAC) 寒天培地に植菌し O157 の菌数を調べた。

C. 研究結果

1. 胆汁と肝臓内の腸内細菌科細菌数

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 検体の胆汁から腸内細菌科細菌は検出されなかったが、2 検体で 10^1 ~ 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

牛肝臓内から腸内細菌科細菌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 汚染は牛をと殺する際、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ている。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も有効である一方、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 ^{>}	10 ^{>}
10	10 ^{>}	10 ¹ -10 ²
4	10 ^{>}	10 ³ -10 ⁴
1	10 ^{>}	10 ⁵ -10 ⁶
2	10 ¹ -10 ²	10 ³
1	10 ⁵	10 ⁴
1	10 ⁶	10 ³
1	10 ⁷	10 ⁶

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