

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 (H25-食品-一般-011)

総括研究報告書

研究代表者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

現在わが国の畜産食品は、これまで生食されなかったものが生食されるなど、食文化が多様化してきている。しかしながら、畜産物の生食は腸管内の微生物や寄生虫等による食中毒の危険性が高く、近年、食中毒事例が頻発していることから、畜産物の生食による食中毒を未然に防止するための畜産物中の食中毒菌の検査手法や除去方法を提供する必要がある。本研究では、腸管出血性大腸菌などの細菌と生食でしばしば問題となる寄生虫を主な危害の対象として、動物の食肉や内臓肉を生で食することのリスクについて、牛、馬、豚等について検討した。

まず、食肉の生食実態及び製造上の衛生管理について情報収集を行い、食肉を生食することのリスクについて危害分析を行った。牛の消化器については、大腸菌群等の汚染実態及びその季節変動について明らかにした。また、我が国における馬肉中の住肉胞子虫試験方法の検討及びシカ肉中の住肉胞子虫汚染実態を明らかにした。

次に本研究班では、畜産食品中の病原微生物を生食の可能なレベルまで低減する方法について検討した。海外で食肉に用いられている放射線殺菌法が牛肝臓に対しても有効であるかの検証を昨年度に引き続き行い、有効性が認められる条件を明らかにすると共に、処理によって発生する副生成物について解析した。また、高圧処理による殺菌方法についても検討し、昨年度に見られた肝臓の硬化及び変色を起こしにくい条件での微生物削減について検討した。

分担研究者：	川崎 晋	独)	農研機構	食品総合研
等々力 節子	独)	農研機構	食品総合研	究所
研究所	都築和香子	独)	農研機構	食品総合研
山崎 伸二	大阪府立大学大学院	究所		
鎌田 洋一	岩手大学	日根野谷淳	大阪府立大学大学院	
荻原 博和	日本大学	白藤由紀子	岩手大学	
五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所	佐藤 弘隆	岩手大学	
		阿部 申	日本大学	

研究協力者：

A. 研究目的

日本国内で平成 23 年に発生した、牛肉の生食による腸管出血性大腸菌集団食中毒事例をきっかけに、食肉及び内臓肉を生食することの危険性が広く再認識された。食の安全を確保するため、生食用牛肉の加工基準の設定及び牛肝臓の生食禁止という行政措置が実施されたがその一方で、豚肝臓の生食の増加、ジビエと呼ばれる野生鳥獣肉の喫食が増加しつつあり、これまでとは異なる健康被害の可能性が高まっている。また、牛肝臓の生食の安全性を確保することにより、規制の解除を求める声もみられている。本研究では、食肉及び内臓肉を生で食することによるリスクを明らかにすることを目的として、海外における生食用食肉の製造時の衛生管理実態の調査や、国内での牛の消化器部位における大腸菌群等の汚染実態調査と季節変動、食肉中の寄生虫汚染実態に関する調査等を行った。更に、畜産食品を汚染する食中毒菌を低減することを目的として、放射線照射及び高圧殺菌の効果と問題点について科学的に検討した。

## B. 研究方法

### (1) 海外における食肉の生食用食肉製品の衛生管理の実態調査

株式会社三菱総合研究所への委託事業として、文献調査、インターネットを通じた調査及び在日大使館への聞き取り調査を通じて、ドイツにおける豚肉の生食製品であるメットの製造工程における衛生管理実態及び健康被害について情報を収集し、その結果について検討した。

### (2) 馬肉中の住肉胞子虫の遺伝子検査法の検証とエゾシカ肉中の住肉胞子虫汚染調査

馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法には、株式会社 千興ファーム（熊本県）から購入した 7 頭分の馬横隔膜を用いた。現行検査法に基づき、DNeasy Blood & Tissue Kits を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて、定性 PCR を行った。プライマーは厚生労働省通達の現行検査法で使用されているものを用いた。得た PCR 産物について、当研究室保有の *Sarcosystis fayeri* 遺伝子陽性コントロールとともに、アガロースゲル電気泳動を行い、約 1100 bp の遺伝子増幅産物が確認されたものを陽性と判定した。

定量 PCR は、各検体から 0.3 g の馬肉を 2 か所採取し、DNA を抽出した。また、同じそれぞれの検体から、馬肉を 10 g を 2 か所採取し、ぶつ切りにしたものに PBS 30 mL を加え、ホモジナイザーで均質化した。均質化後、粥状になった馬肉サンプルを 200  $\mu$ L 採取し、DNeasy Blood & Tissue Kits を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて定量 PCR を行った。使用したプライマーは、八木田 健司 博士（国立感染症研究所）が設計した *Sarcocystis* 属共通遺伝子配列を利用したプライマーを参考に作成し、NIPPON GENE から供与された *S. fayeri* 遺伝子陽性コントロールを用いて、絶対定量を行った。遺伝子陽性と判定された検体から、馬肉 0.3 g を 8 か所、馬肉 10 g を 8 か所採取した。前述の方法と同様に DNA を抽出し、遺伝子定量用のプライマー で定量 PCR を行った。また、この結果を用いて、馬肉 10 g 均

質化検体に 1~8 の番号をつけ、乱数発生ソフトウェア (http://tools.huu.cc/rand/) によって乱数を発生させ、馬肉を 20 g、30 g、40 g 用いて実験をした場合の相対標準偏差 (以下、rSD) を推察した。馬肉 20 g を用いた場合の実験結果を推察する場合、2 つの乱数を 8 回発生させ、出た乱数の番号の検体遺伝子コピー数に基づき標準偏差 (以下、SD) および rSD を算出した。

エゾシカ肉の住肉孢子虫遺伝子検査は、北海道のシカ肉販売業者より分与を受けたエゾシカ肉 50 検体 (横隔膜部分) を用いた。シカ肉中の住肉孢子虫遺伝子検査法は、厚生労働省が通知した住肉孢子虫定性遺伝子検査法を適応した。PCR 産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子陽性か否か判断した。

### (3) 牛消化管内の大腸菌群等の分布

牛消化管組織内の大腸菌群細菌数の測定と PCR 法による *stx* 遺伝子の検出は、牛の屠畜解体直後に唾液 (n=41)、第一胃 (n=46)、十二指腸 (n=68)、盲腸 (n=69)、直腸 (n=65) のそれぞれの内容物と胆嚢 (n=65)、肝臓 (n=69) と胆汁 (n=69) を採取し直ちに研究室に持ち込み実験に供した。肝臓に滅菌 PBS に加え、ストマッカー処理を 30 秒間以上行ない、得られた懸濁液と原液の胆汁を直接滅菌 PBS で希釈し、マッコンキー寒天培地に植菌して、37°C で一夜培養し大腸菌群細菌数を測定した。さらに、ストマッカー処理した肝臓検体と胆汁検体に 1.25 倍の TSB を加え 37°C、18 時間、浸透培養し、得られた増菌培養液に TE buffer を加えて加熱し、

その上清を鋳型 DNA として *stx* 遺伝子の検出するための PCR を行なった。

肝臓内の大腸菌群細菌の分布と *stx* 遺伝子の PCR による検出は、牛肝臓を可食部に相当する部位 1 と 2、非可食部の 3、4、5 とに分け、胆汁と共に大腸菌群細菌数の測定と PCR 法による *stx* 遺伝子の検出を試みた。

### (4) 放射線照射による微生物除去

微生物試験用の牛肝臓試料は、つくば市内の精肉店より凍結状態の牛肝臓塊、もしくは東京芝浦食肉処理場にて屠殺直後に凍結した牛肝臓塊を用い、購入後 -80 で保存した。牛挽肉はつくば市内の精肉店より購入した。試料は 25 g の塊となるよう無菌的に切り分け、各々ガスバリア性の袋に移した後、-80 で冷凍保存した。品質評価用の牛肝臓試料は、東京芝浦食肉処理場より、屠殺した翌日または翌々日に、冷蔵状態で入手した。肝臓は入手日のうちに 50g 程度の塊に切り分けて、ガスバリア袋 (PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 180 × 250mm) に入れ、含気状態または脱気状態で包装した。包装後の試料は、冷蔵 (0 ) 照射では照射氷中に 3 時間、凍結 (-80 ) 照射では超低温槽に一晩保管し、照射前の温度を恒温とした。

供試菌は、研究機関および研究協力機関が所有する *C. jejuni* 5096 株を用いた。

供試菌は Brucella Broth (Difco) を用いて、微好気条件下で 41.5 一昼夜静置培養した後、遠心分離 (4000 g, 5 min) により菌体を収集、培地成分を除去した。

菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 $10^9$  CFU/mL となるように調整、使用した。

ガンマ線照射はコバルト 60 線源を装填した Gamma Cell 220 を用いた。照射時の温度は、氷冷 (0 ) および冷凍 (ドライアイス下) (-80 ) の 2 条件を設定した。照射中の温度を一定に保つため、照射チャンバーと同形状の筒状型発泡スチロール箱を作成し、この中央に予冷した検体を入れ、周囲に氷 (0 ) もしくはドライアイス (-80 ) を封入した。

吸収線量は試料に装着したアラニンペレットの信号を ESR 装置で測定して決定した。検量線は英国の National Physical Laboratory の標準アラニンペレットで作成した。

菌体の接種は、自然解凍後した牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液を注射針により注入することで行った。菌体濃度は終濃度で、 $10^8$  CFU/g 程度となるように調製した。菌体接種後の試料は、直ちに、ガスバリア袋 (PTS 袋) を用いて含気あるいは真空包装を行った。含気条件では、ヘッドスペースに空気を残し、脱気条件では、真空包装機を用いて、袋内の空気を抜いてヒートシールした。包装後の検体は、氷中もしくは -80 の冷凍庫内で 2 時間以上放置して温度を一定にした後、冷蔵では 0 ~ 1.2 kGy、冷凍では 0 ~ 3.0 kGy の範囲の線量を照射した。照射後の検体は直ちに、もしくは解凍後直ちに菌数計測した。

ガンマ線照射後の検体は、滅菌緩衝ペプトン水 (BPW) を加えて 10 倍乳剤とし、必要に応じてその 10 倍段階希釈試料液を調製した。各 10 倍段階希釈試料液は、標

準寒天平板および mCCDA 平板にスパイラルプレーティング法で塗抹した。標準寒天平板は好気条件で 35 、mCCDA 平板は 41.5 で各々 48 時間培養し、その出現集落数から 1 g 当たりの一般生菌数ならびに *C. jejuni* の数を求めた。mCCDA 平板上の集落については、平板あたり 5 つの集落を選択し、これらをイムノクロマト法による *Campylobacter* 同定キットに供し、典型集落が *Campylobacter* 属であることを確認した。

TBA (チオバルビツール酸) 価の測定は、(一財) 日本食品分析センターに委託して実施した。

照射および非照射の牛肝臓にメタノールを加えてホモジナイザー (AM-8 型, Nissei) で 2 分間攪拌後、抽出液をろ過した。さらに残渣をクロロホルム/メタノール (2:1 X C/M) 溶液で 2 回抽出後 C/M 溶液で洗浄した。集めた抽出液に 0.88% KCl 溶液を加えて分液ロト中で混和し、1 晩放置後、クロロホルム層を集め、硫酸ナトリウムで脱水した後に濃縮し、Hexane/ 2-prpopanol (3:2) 溶液で定容した。脂質溶液から 25mg 分の脂質を秤取り、2mg のトリデカン酸を内部標準として添加し、3 フッ化ホウ素メタノール試薬により脂肪酸をメチルエステル化し、GC で分析した。

2-アルキルシクロブタノン分析は、牛肝臓に硫酸ナトリウムを加え乳鉢中で均一に混和し、氷上で 30 分放置した。これをステンレス製遠心チューブに移し、ヘキサンを加え、高速ホモジナイザー (ヒスコトロン NS-52 型, マイクロテック社製) で 1 分間攪拌後、 $10,000 \times g$  で 10 分

間遠心し、ヘキサン画分を集めた。この抽出操作を繰り返し、集めたヘキサン溶液に硫酸ナトリウムを加えて脱水した。ヘキサン抽出液の溶媒を留去後、抽出物をアセトンに再溶解し、さらにアセトニトリルを加えて-20℃で30分以上冷却して脂肪分を析出させた。これを0.1, 680 x gで10分間遠心して取り除き、2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)が含まれる上清を濃縮して、ヘキサンに再溶解した。この溶液をガラス製のシリカゲルカラム(Merck Silica gel 60 70-230 mesh) 2本に添加し、ヘキサンで洗浄後、ヘキサン/ジエチルエーテル(98:2)で溶出し、その5-15mL画分を集めた。この試料を濃縮してGC-MSで分析し、2-ドデシルシクロブタノン(2-dDCB)および2-テトラデシルシクロブタノン(2-tDCB)、2-テトラデセニルシクロブタノン(2-tDeCB)を定量した。

フランの分析は、牛肝臓の左葉部分を約100gの塊に切り分け、ガスバリア袋に入れ、含気状態のままヒートシールし、予冷の後、3 kGy(0℃)、または10 kGy(-80℃)を照射した。照射後の試料は分析に供するまで、-80℃で凍結保管した。分析は、(一財)日本食品分析センターに委託して実施した。ポリエチレンバックに含気状態で包装した牛肝臓を、氷冷状態(0℃)で6 kGy、ドライアイス下(-80℃)で10 kGyの2条件でガンマ線照射し、照射後の試料は-80℃で保管した。分析時には、未開封の状態の試料を冷蔵庫中に移して解凍し、冷蔵庫から取り出した後、速やかに塩化ナトリウムを入れたヘッドスペースバイアルに採取した。このバイ

アルに、あらかじめ氷冷した精製水を加えた後直ちに密栓し、d4-フラン50 ng(内標準物質)を添加し試験溶液とした。バイアル中のヘッドスペースガスを、ヘッドスペースサンプラーによりガスクロマトグラフ-質量分析計に注入し、得られたピーク高比から、予め作成した検量線を用いて試料中のフラン濃度を求めた。

(5) 高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する検討  
250MPaの高圧処理及び圧力時間が *Escherichia coli* と *Salmonella* Typhimurium に及ぼす死滅効果に *E. coli* ATCC 25922 と *S. Typhimurium* IID 1000 を用いた。培養液は、洗浄後リン酸緩衝液中の菌数が  $10^8$  CFU/mL となるように調整してアンブルに充填し、高圧処理の試料とした。高圧処理装置は、高圧ポンプ、ヨ-クフレ-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。加圧条件は250MPaで60分、120分、180分とした。高圧処理後、ペプトン加生理食塩水を用いて段階希釈を行ってPCA培地を用いて混釈培養し、集落数を計測した。

高圧処理における食品媒介病原細菌の死滅効果の検討には、*E. coli*、*S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Cronobacter sakazakii*、*Providencia alcalifaciens*、*Yersinia enterocolitica*の計7菌株を用いた。各菌株の培養液は、洗浄後リン酸緩衝液中の菌数が  $10^8$  CFU/mL となるように調整して高圧処理の試料とした。加

圧条件は 250MPa で 180 分とした。高圧処理後、アンプルから試料液を取り出し、ペプトン加生理食塩水を用いて段階希釈を行った。これらの希釈液は非選択培地である PCA 培地を用いて混釈し、37 及び各菌の至適温度で 24 時間培養し、発育した集落を計測した。

牛肝臓に接種した *E. coli* の高圧処理による死滅効果の検討は、*E. coli* 10<sup>8</sup> CFU/mL の菌液を使用し、牛の肝臓を横 2cm × 縦 3cm、厚さ 0.5cm 程度・重量 10g の長方形にカットしたブロックに、*E. coli* の菌液を等間隔 10 カ所に合計 100 µl を接種した。接種した肝臓は二重の密封状態にして高圧処理用の試料を作製した。加圧条件は 250MPa で 60 分、120 分、180 分とした。高圧処理後、プラスチックバックから内臓のブロックを取り出し、ストマッカーバックに内臓 10g と希釈水 90mL を分注して、2 分間のストマッキング処理を行い調製した。これらの調製液は希釈水を用いて段階希釈を行い、非選択培地である生菌数用の PCA 培地を用いて混釈し、37 で 24 時間培養した。培養後発育した集落を計測した。さらに *E. coli* 数は選択培地である酵素基質培地；X-MG 培地を用いて混釈し、37 で 24 時間培養し、発育した青色の集落を計測し、*E. coli* 数とした。

高圧処理における肝臓の肉色と硬さの検討は、前項と同様の肝臓をプラスチックバックに密封し、250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行った。高圧処理後の肉色の变化を色差計で測定した。肉質の硬さはレオメーターを用いて測定すると共に、目視で肝臓の肉色さらに肝臓を触感で硬

さを確認した。色差計はミノルタ社製の色彩色差計を使用した。

肝臓の色の変化を L 値、a 値、b 値で測定を行った。硬度計はサン科学社製のレオメーター、CR-3000EX を用いて行い、肝臓の肉質の変化を硬度 (kgf/mm<sup>2</sup>) で測定した。

## C. 研究結果

### (1) 海外における食肉の生食用食肉製品の衛生管理の実態調査

EU 加盟国であるドイツは、EU 食品安全法に適合する形で食品安全対策を実施しており、連邦レベルで定めた法令を各州の責任において公的な監視や食品のモニタリングプログラムとして実施していた。動物由来食品に関する連邦レベルの法令である動物由来食品衛生規則において、ひき肉の製造及び取扱いに関する要件が定められており、製造加工施設、原材料肉、製造前後の衛生管理が定められていた。また、法令遵守に対する公的な監視や食品モニタリングプログラムは各州の責任において実施されているが実際に監視を行うのは州の下にある地方自治体である郡あるいは郡独立市の獣医局等であった。食品企業や飲食店等の監視項目としては、設備、作業方法、衛生要件の遵守、トレーサビリティ、企業の自己検査、表示・宣伝等があった。企業や事業所に対する監視活動については、連邦レベルで統一的な枠組みが規定されており、企業や事業所への立入検査の頻度を決定する算定方法が示されており、州はこの算定方法の結果に基づき、企業や事業所への立入検査を実施していた。メットの喫

食による健康被害の実態は、2007年から2012年にかけて、14件見られた。その原因物質は、メットの生食によるものではサルモネラ、カンピロバクター、寄生虫（サルコシスティス）、ノロウイルスであった。メットによる食中毒14件中5件では、原料に生卵を用いており、原因菌が生卵から検出された例も1例見られた。

## (2) 馬肉中の住肉孢子虫の遺伝子検査法の検証とエゾシカ肉中の住肉孢子虫汚染調査

馬肉の住肉孢子虫遺伝子検査法改良の検討：定性PCR遺伝子増幅の結果から馬肉のうち、1検体は採取した2か所とも遺伝子増幅は確認されなかった。2検体は2か所採取したうち、片方のみ遺伝子増幅が確認された。また、4検体では採取した両方で遺伝子増幅が確認された。これらの結果から、2か所とも陰性の検体は住肉孢子虫遺伝子陰性、残りの検体は住肉孢子虫遺伝子陽性と判断した。住肉孢子虫遺伝子陰性検体と陽性の2検体を用いて定量PCRを行った。馬肉0.3gを用いる方法と10gを均質化して検査に供する方法の比較を行った。遺伝子陰性と判定された検体で、馬肉0.3gを用いる方法では遺伝子増幅が検出されなかったが、馬肉10gを用いる方法では遺伝子増幅が検出された。また、陽性2検体では、馬肉10gを均質化する方法で、0.3gを用いる方法より低いrSDが得られた。

陽性検体の一方から馬肉10gを8か所採取し、均質化後、DNAを抽出した。他方の陽性検体からは馬肉0.3gを8か所採取し、現行検査法と同様にDNAを抽出し

た。それぞれの抽出DNAを用いて定量PCRを実施した。馬肉10gを均質化する方法では、馬肉0.3gを用いる方法よりも、低いrSDを示した。乱数発生ソフトウェアを用いた解析の結果では、想定サンプル馬肉量を増量することで、標準偏差および相対標準偏差がともに低下した。

エゾシカ肉における住肉孢子虫汚染状況：厚生労働省が通知した住肉孢子虫遺伝子定性検査法が妥当かどうか、シカ肉よりシストを取り出し、DNA抽出を行った。住肉孢子虫遺伝子定性PCRを、抽出DNAに適応したところ、明瞭に遺伝子増幅が確認された。以上の結果は、馬肉中の住肉孢子虫遺伝子定性検査法が、シエゾシカ肉中の同寄生虫遺伝子検査に適応できることを示している。

エゾシカ肉よりDNAを抽出し、住肉孢子虫18S rRNA遺伝子共通配列について、PCRを行った。50検体のうちの48検体から、住肉孢子虫18S rRNA遺伝子の増幅が確認された。

エゾシカの推定年齢と遺伝子陽性率との関係は、遺伝子陽性率が非常に高いため、推定年齢との関係は不明だった。

## (3) 牛消化管内の大腸菌群等の分布

牛消化管組織内容物の大腸菌群細菌数を測定したところ、唾液から肛門にかけてほぼ100%で大腸菌群細菌が検出された。検出された細菌数も第一胃から肛門に近づくに従って高くなった。しかしながら、胆汁では14%、肝臓では68%で陽性となった。

牛消化管組織内容物の*stx*遺伝子のPCR法による検出では*stx*遺伝子は肛門組織



ンス酸も加えた総トランス脂肪酸量について、非照射試料と比較して統計的な有意差が認められた。凍結下の照射でも10kGyでは統計的に有意なトランス酸の増加が認められた。含気包装と脱気包装の同一温度、同一線量でのトランス異性体の量は統計的には有意な差は認められず、TBA 価の場合と異なり、包装条件による影響はほとんど認められなかった。

今回の照射条件の範囲内では、飽和脂肪酸の割合の増加や、多価不飽和脂肪酸の減少は認められなかった。

2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)は照射より特異的に生成する脂質の放射線分解物であるとして、照射食品の検知の指標物質として利用されている。分析方法の精度確認として、分析に用いた肝臓と同ロットの試料に標準試薬をスパイクして添加回収率を求めた。この試験は、実試料の分析期間の最初と最後及び中間の期間の3日に分けて3併行で実施した。低濃度添加として、2-dDCB および 2-tDCB を 2 ng/g FW、2-テトラデセニルシクロブタノン(2-tDeCB) を 5 ng/g FW で、スパイクして行った際の回収率は、 $64.7 \pm 10.3$ 、 $68.3 \pm 9.8$  および  $62.7 \pm 9.8\%$  (n=9)であった。また、高濃度添加として2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB を 20 ng/g FW、20 ng/g FW、51 ng/g FW で添加した際の回収率は  $59.6 \pm 4.1$ 、 $59.9 \pm 4.3$  および  $61.8 \pm 5.1\%$  (n=9)であった。

3種の異なる温度包装条件で照射した際の2-ACBsの定量結果では、非照射のコントロール試料からはいずれの2-ACBsも検出されなかった。また、同一の温度と包装条件下の照射では、線量にほぼ比例

して、3種の2-ACBsが検出された。そこで、同一条件での分析値を線量に対して直線回帰した傾きから、1kGyあたりに換算した2-ACBsの生成量を求めて表5にまとめた。この際の相関係数は、0.87~0.97であった。

肝臓生重量・1kGyあたりの2-dDCBおよび2-tDCBの生成量は、2-tDCBの含量が2-dDCBの含量に比べて大きく、-80に比べて0の照射の方がやや大きな値となった。一方、オレイン酸を前駆体とする2-tDeCBは、-80照射における生成量が0照射の場合に比べて著しく大きくなった。なお、包装条件により同一温度内での2-ACBs生成量には若干の差がみられるものの、分析値の変動を考慮すると有意な差としては検出されないと考えられた。

今回採用した分析条件において、繰り返し測定標準偏差に基づいて求めた、フランの定量下限値(LOQ)および検出限界値(LOD)はそれぞれ2ng/g FWおよび0.5ng/g FWであった。牛肝臓を分析した結果、照射(6kGy 0、10kGy-80)および未照射試料のいずれにおいても、定量下限を超える濃度のフランは検出されなかった。

(5) 高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する検討  
高圧処理前の *E. coli* 菌数は 9 log CFU/mL であった。これらの菌液を 150MPa の高圧処理を行ったところ、60分、120分、180分と処理時間が長くなるにつれて菌数が減少する傾向が見られるものの、有効な死滅効果は認められなかった。

200MPa では 60 分処理で 7 log CFU/mL, 120 分処理で 6 log CFU/mL, 180 分処理で 5 log CFU/mL と直線的に菌数が減少する傾向が認められた。250MPa では 60 分処理では、9 log CFU/mL から 6 log CFU/mL と約 3 D の死滅効果が得られ、120 分処理では 5 log CFU/mL、180 分処理では 3 log CFU/mL となり、約 5 D の有効な殺菌効果が認められた。*S. Typhimurium* では、未処理の菌数が 9 log CFU/mL のものが、150MPa では 180 分処理で 7 log CFU/mL に減少した。200MPa では 60 分処理で 8 log CFU/mL に、180 分処理では 6 log CFU/mL に減少し、3 D の死滅が認められた。250MPa では 150 や 200MPa に比べて菌数の減少効果は高く、60 分処理では 6 log CFU/mL に、120 分処理では 4 log CFU/mL、180 分処理では 3 log CFU/mL にまで減少した。*E. coli* と *S. Typhimurium* はいずれも約 5 D の有効な殺菌効果が認められ、低圧の 250MPa でも高圧処理の時間を数十分の単位から時間の単位に延長することにより、高圧の 400MPa と同等の殺菌効果が得られることが確認された。さらに、処理時間の延長は緩やかな殺菌効果であるものの、有効な殺菌効果を得ることが可能であると推察された。

食品媒介病原細菌の死滅効果の検討では、未処理での菌数は約 8~9 log CFU/mL であった。250MPa で 180 分処理を行った結果、生残菌数は *S. Typhimurium*、*P. aeruginosa* と *E. coli* では 3 log CFU/mL となり、5 D の殺菌効果が認められた。さらに *C. sakazakii* では 2 log CFU/mL、*Y. enterocolitica*、*P. alcalifaciens*、*S. Enteritidis* の 3 菌種では 2 log CFU/mL

以下の数値で検出され、高圧に対する感受性が高い結果であった。

以上の結果、食品媒介病原細菌 6 菌種について 250MPa で 60 分処理を検討したところ、5 D の有効な殺菌効果が認められ、*E. coli* のみではなく他のグラム陰性の病原菌にも有効であることが明らかとなった。

牛肝臓に接種した *E. coli* の高圧による死滅効果の検討では、高圧未処理の肝臓からは生菌数及び *E. coli* 数は 7 log CFU/g を示した。これらを 250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行ったところ、60 分処理では生菌数及び *E. coli* 数は 1D の減少、さらに 120 分処理では 2 D の減少が認められた。さらに 180 分では生菌数で 3 D、*E. coli* で 2 D の死滅が認められた。

肝臓の色調と硬さに及ぼす高圧処理と処理時間の影響では、未処理の肝臓の肉色は L 値が  $34.14 \pm 0.93$ 、a 値が  $9.50 \pm 0.23$ 、b 値が  $4.43 \pm 0.50$  であった。250MPa の圧力処理を行うと 60 分処理で L 値が  $41.74 \pm 0.48$ 、a 値が  $16.17 \pm 0.51$ 、b 値が  $7.04 \pm 0.79$  となり、高圧処理では L 値である明度が明るくなる傾向が認められ、さらに a 値の赤みはより赤くなる傾向が観察された。120 分処理では L 値が  $43.33 \pm 1.17$ 、a 値が  $15.71 \pm 0.93$ 、b 値が  $7.18 \pm 1.26$  となった。さらに 180 分処理では L 値が  $45.68 \pm 0.95$ 、a 値が  $14.29 \pm 0.38$ 、b 値が  $7.21 \pm 0.62$  となり、圧力処理時間の延長とともに肝臓の色彩は、明るい色を示し、高圧処理を行うと赤みが増加するが、処理時間が長くなるにつれて僅かであるが減少する傾向が認

められた。高圧処理における肝臓の硬さの変化は、レオメーターを用いて検討を行った。肝臓の硬さは、硬度の数値で示した。未処理の状態では  $0.0152 \pm 0.0068$  kgf/mm<sup>2</sup> を示し、250MPa では 60 分処理を行うと  $0.0246 \pm 0.0046$  kgf/mm<sup>2</sup>、120 分処理では  $0.0249 \pm 0.0048$  kgf/mm<sup>2</sup>、180 分処理では  $0.0343 \pm 0.0088$  kgf/mm<sup>2</sup> の数値が得られた。肉の硬度は 250MPa の圧力では時間の経過とともに数値は高区なる傾向を示した。しかし、触感では明らかに硬いと思われる感触ではなかった。高圧処理による肝臓の目視及び触感では、未処理と高圧処理との間には明らかな相違が観察されたものの、高圧後は肝臓の肉色は未処理のものより赤みがかかった色彩を示した。しかし、処理時間に関しては感覚的に色合いや硬さについては処理を行うことによって顕著な差は感じられなかった。

#### D. 考察

昨年度の研究で、ドイツのメットについては、容器包装されスーパー等で市販されていることが明らかとなったため、日本国内での畜産食品の衛生管理等に参考とする目的で、今年度はメットの衛生管理及び規格基準についての情報を収集した。ドイツにおいてメット独自の公的な微生物成分規格はなく、ひき肉製品の製造加工要件が定められており、その遵守については連邦ではなく州レベルでの監視・モニタリングが行われていることが明らかとなった。また、製造販売業者は衛生管理に関して外部認証を取得しており、出荷前の自主検査と共に外部監査

機関での検査も実施していることが明らかとなった。一方で、近年においてもドイツでメットの喫食によるサルモネラ症及び旋毛虫症等の発生が見られていることから、現在行われている衛生管理手法の元であっても、健康被害発生を完全に防ぐのは困難であると考えられた。

現行の住肉孢子虫遺伝子検査法に基づき 0.3 g の馬肉を採取し、DNA を抽出、定量 PCR に用いる場合、遺伝子コピー数のばらつきは非常に大きいことがわかった。馬肉 10 g を均質化後、DNA を抽出し、定量 PCR に用いる方法で、よりばらつきの少ない結果が得られた。また、サンプリング量を 10 g、20 g、30 g、40 g と増量した場合のばらつきを推定すると、増量とともに相対標準偏差が低下した。この結果は、遺伝子コピー数のばらつきを減少させるためには、検体から DNA を抽出する前に、多量の検体を均質化することが有効であることを示している。しかしながら、多量の馬肉サンプルを用いて検査することには困難が伴うこともある。単純に増量していくだけではない工夫が求められる。

北海道に生息するエゾシカについて、住肉孢子虫の汚染状況を調査した。その結果、96%のエゾシカ肉中から住肉孢子虫遺伝子が検出され、同孢子虫の汚染が蔓延している危険性が推察された。エゾシカ肉が食用に転用される実績がすでにあり、今後、大きく発展する可能性がある。エゾシカ肉中における住肉孢子虫の危害性を評価する必要がある。

住肉孢子虫は、ウマやシカの筋肉中にシ

ストとして寄生する。住肉孢子虫の寄生は宿主の健康に影響を与えず、シスト中のブラディゾイトは、宿主が死なない限り、シスト内に最大数まで増殖する。ウマやシカの年齢が高まるにつれ、住肉孢子虫の寄生率が上昇することが推察される。また、スポロシストを継続的に摂取すれば、住肉孢子虫の汚染は深刻化する。本報告で示したように、定性 PCR では、エゾシカの年齢と住肉孢子虫寄生との関係は非常に頻度の高いものではあるが、汚染の濃淡は判断できない。年齢との関係も不明である、今後、住肉孢子虫遺伝子の定量的解析をする必要がある。

牛肝臓内の大腸菌の分布とその殺菌法の検討については、当初、牛肝臓内で検出される腸管出血性大腸菌及び大腸菌群細菌は、胆汁に汚染している菌が胆管を通して肝臓内を汚染すると考えていた。しかし、今回得られた結果では、胆汁中の大腸菌群細菌と肝臓内で検出された大腸菌群細菌とは相関性が無く、単純にと畜解体後に胆汁中の菌が肝臓内を汚染しているのではない可能性が示された。*stx* 遺伝子についても同様で、今回調べた範囲で胆汁からは *stx* 遺伝子は全く検出されなかった。肝臓内で *stx* 遺伝子が検出された場合も、非可食部位に相当する 3、4、5 であった。一方、可食部位に相当する 1 と 2 では大腸菌群細菌が検出されたが、その割合は気温の高い夏場に多く、気温の低い冬場に少ない傾向にあった。しかし、*stx* 遺伝子は、夏場、冬場に関わらず検出されなかった。このことは、可食部位に STEC が存在する可能性は低く、

何らかの方法で大腸菌群細菌のみならず腸内細菌科菌群を殺菌することができれば、生食用のレバーが提供できる可能性が考えられる。何故、非可食部位の 3、4、5 で *stx* 遺伝子が検出されたかは、今後の課題である。

放射線照射による微生物除去では、過去研究事例から、*Campylobacter* 属はガンマ線に対する抵抗性は低いことが示唆されてきた。Rocelle らによれば、低脂肪の牛挽肉条件下で本菌の冷蔵下 (3~5 ) および凍結 (-17~-15 ) でガンマ線を照射した場合、その  $D_{10}$  値は 0.175、0.235 と報告されており、本研究ではそれと比較して若干高めに観察された。これは本研究で用いた供試菌の抵抗性が高いというよりも、現在の *Campylobacter* 検出培地の高性能化および微好気培養条件の発達により検出率が改善したためと予想された。しかしながら過去の牛挽肉での研究事例にもあるように、本研究においても大腸菌 0157 株よりも本菌の抵抗性は低く、牛肝臓においてはガンマ線抵抗性の試験指標菌として *Campylobacter* を詳細に検討する必要はないと考えられた。

ガンマ線照射による TBA 価 および脂肪酸含量については、これまでの研究の成果から、微生物の殺滅に必要なガンマ線の量は、冷蔵 6 kGy、凍結 (-80 ) で 10 kGy を超えることは無いと見通せる。トランス異性化については、牛肝臓の脂質含量が 5%未満であることも考慮すると、今回の研究の範囲の最大変化量でも、国際機関の推奨するトランス脂肪酸摂取量 (総摂取エネルギーの 1%未満、1800kcal 摂

取する人のトランス脂肪酸摂取推奨量は2g未滿)を考慮すると、照射による牛肝臓のトランス脂肪酸量の増加は、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えないと考えられる。

またLiらは、常温(20 )での牛挽肉のガンマ線照射において、6.74kGy以上の照射でアラキドン酸(20:4)等の多価不飽和脂肪酸の含量の有意な低下を報告しているが、今回の研究結果からは、飽和脂肪酸の割合の増加や高飽和脂肪酸の減少は認められなかった。2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)の生成については、照射食品中での安全性に関しては多くの議論もあるが、その含量が微量であること、エームス試験等の変異原性試験が陰性であること等を理由に、ヨーロッパ食品安全機関(EFSA)では、照射食品摂取の際の健康影響は無視できると結論している。<sup>13)</sup> また、最近、Yamakageらは2-ドデシルシクロブタノン(2-dDCB)および2-テトラデシルシクロブタノン(2-tDCB)の遺伝毒性を否定した論文を公表し、Satoらも、2-tDCBの発がんプロモーション活性を検出出来なかったとの報告している。ただし、わが国では、照射食品の安全性に関する評価が定まっていないことから、照射により生成する可能性のある2-ACBsを定量的に把握する必要があると考えた。2-dDCBおよび2-tDCBについては、Ndiayeらは6-8 で照射牛肉中の2-dDCBおよび2-tDCBの生成効率として、1.0 および 1.0 nmole/mole FA/kGyを報告している。また、Marchioniらは、6-8 で照射した牛肉の、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCBの生成効率を、1.33、1.59、

1.67 nmole/mole/kGyと報告している。今回の肝臓の分析結果は、回収率を60%程度と見込んでも、これらの報告値に比べて、生成効率はやや低めであった。この理由としては、照射温度の違いが大きく影響していることが予測される。いずれにせよ、今回の実験で用いた条件下の牛肝臓の1kGyの照射で、多くの畜肉類で報告されている前駆脂肪酸1mmoleあたり1~2nmoleという生成効率を大きく超えるようなことは無いと判断された。以上より、牛肝臓の脂質含量が牛挽肉等の畜肉に比べて低いことを考慮すると、殺菌に必要な線量が牛挽肉に比べて小さくなったとしても、すでに米国等で許可されている牛挽肉に比べて多量の2-ACBsが照射牛肝臓中に生成することは無いものと予測された。

高圧処理については、昨年度の結果を踏まえて、高圧条件を400MPa~500MPaのような高い圧力ではなく、150~250MPaの比較的低い圧力での*E. coli*の不活化の検討を行った。その結果、150MPaでは有効な殺菌効果は見られなかったが、200MPaから殺菌効果が認められ、特に今回検討した250MPaは処理時間の経過とともに殺菌効果が高まる傾向が認められた。250MPaで180minでは食品媒介病原細菌の低減化に有効な結果が得られ、*P. aeruginosa*, *E. coli* S. Typhimuriumでは5Dの死滅効果がみられ、さらに*S. Enteritidis*, *P. alcalifaciens*, *C. sakazakii*, *Y. enterocolitica*では6D以上の殺菌効果が得られた。一方、実際の肝臓に*E. coli*を接種して高圧処理

(250MPaで180min)を行った結果では、2D程度の死滅効果しか得られなかった。緩衝液に懸濁した殺菌効果と肝臓に接種した実験結果ではかなり異なる結果となり、さらに処理条件である圧力と処理時間の検討が必要であると思われた。肝臓の物理的な肉質に関連して150~250MPaで60分、120分、180分処理を肝臓に施したところ、肉色については150MPaから200MPa、200MPaから250MPaと高い圧力になるほど明るい色調を示した。500MPaの高い圧力に比べて色調の変化は少なく、良い肝臓の色調を維持し、やや赤みがかかった色合いであった。肝臓の硬さについては、250MPa処理を行うと硬さの数値は高くなる傾向が見られるものの、未処理のものに比較してやや硬くなる傾向が認められているが、生肝臓と比較しない限り明瞭な違いは見られなかった。

高圧処理は肝臓中の *E. coli* (腸管出血性大腸菌) のリスク低減には有効と考えられるが、これらの高圧条件に更なる有効な殺菌方法を組み合わせた処理法の検討が必要であると考えられた。一方、生レバーとしての食味と食感は異なることとなり、生レバーとしての価値が見いだせるものか不明瞭で検討の必要があると考えられる。肝臓の物理的な変化は従来400MPa~500MPaの圧力と異なり、比較的穏和な処理のため肝臓の色合いや柔らかさは残存し有効であると考えられた。最終的には専門的な官能検査も必要となると考えられた。以上のことから、250MPaで180分の高圧処理は、肝臓のそのものは顕著な肉色や肉質の変化は認められなかったものの、やや *E. coli* に対する不

活化効果は十分ではない結果となった。今後は加圧処理時間の延長やさらなる不活化データの構築も必要と考えられた。最終的には実際に腸管出血性大腸菌を用いた殺菌効果の検討や製造工程においても一貫した衛生管理システムの導入が必要であると考えられた。

## E. 結論

海外で販売されている生食用食肉製品の衛生管理について、昨年度の調査でドイツにおいて流通販売されていることが明らかとなった豚肉生食製品であるメットの衛生管理及び規格基準についての情報を収集した結果、メットを対象とした微生物規格基準は存在しておらず、連邦政府による挽肉の加工要件が規定されており、その遵守を州が監視、モニタリングすることが定められていることが明らかとなった。一方で、サルモネラ、カンピロバクター及び寄生虫等を原因物質とする健康被害の報告がドイツで見られ、現行の衛生管理対策でも完全に健康被害の発生を防ぐのが困難であることが示唆された。

畜産食品を汚染する危害の一つである *Sarcocystis* 属住肉胞子虫について、馬肉からのPCR法による検出とエゾシカ肉の住肉胞子虫汚染調査を行った。住肉胞子虫の存在が確認された馬肉から10g、あるいは現行検査法で指定している0.3gを採取して、18S rRNA 遺伝子コピー数について検討したところ、均質化した馬肉量が0.3gの場合には陰性だったサンプルでも、10gの均質化液のDNAを用いる

と標的遺伝子の増幅反応が検出された。均質化する馬肉量を増量し、DNA を抽出することにより、住肉孢子虫遺伝子検査法を改良できると考えられた。また、シカ肉 50 検体について、住肉孢子虫の汚染率を調査したところ、48 検体に住肉孢子虫遺伝子を検出したため、今後食中毒危害性を評価する必要があると思われた。

牛肝臓内の大腸菌群汚染は、単純にと畜解体後の細菌汚染でなく、現在は不明であるが別の理由が考えられる。牛の肝臓内の大腸菌群細菌による汚染は、気温の高い夏場に多く、気温の低い冬場に少ない傾向にあった。さらに、通常生レバーとして提供される可食部位では検出される大腸菌群細菌数、陽性率も低く *stx* 遺伝子は検出されなかった。

牛肝臓内部に接種した *C. jejuni* 5096 株の  $D_{10}$  値は、氷冷 (0 ) 脱気条件で 0.33 kGy、凍結 (-80 ) 脱気条件で 0.69 kGy, であった。また、非照射試料を凍結し融解する操作で約 1 桁の菌数低減があった。これらの結果を前年までの結果と合わせると、ガンマ線殺菌の効果を判定する指標菌としては、その放射線感受性の点から *Salmonella* を選択することが適切と判断された。

冷蔵 6kGy、冷凍 10 kGy までの照射で、不飽和脂肪酸の有意な減少は無かったが、照射によるトラ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。含気包装と脱気包装の違いによる影響は少なかった。脂質の放射線分解物である 2-アルキルシクロブタノン類として、2-dDCB、

2-tDCB、2-tDeCB の照射による線量依存的な生成を確認した。生成量は包装条件の違いによる影響は少なく、前駆脂肪酸 1mmole から 1kGy の照射で生成する 2-ACBs のこれまでに牛肉で報告されている効率と同程度かそれ以下であった。

フランについては、冷蔵(0 )、冷凍 (-80 ) の含気条件かで、殺菌効果を得るより十分大きな線量である 6kGy、10 kGy で照射をしても、定量下限を超える濃度のフランは検出されないことを確認した。

250MPa で 180 分の高圧処理は、食品媒介病原細菌の菌数低減には有効であった。牛肝臓に対する影響は、色や硬さの面やや赤みや硬さの変化が認められるものの一定の評価が得られた。次年度は更なる有効な殺菌デ - タの構築が必要で、特に相乗効果により病原菌のリスク低減のための検討を進める予定である。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1 .等々力節子, 川崎晋, 放射線殺菌, 食品衛生学雑誌, 55(6)J215-218(2014)
- 2 . 鎌田洋一他, 2014 . 厚生労働省食中毒統計にみる寄生虫性食中毒 . 食品衛生研究 投稿中。

### 学会発表

なし

講演・研修会等

1. 等々力節子, 放射線殺菌, 第 107 回  
日本食品衛生学会学術講演会シンポジウ  
ム H26. 5.16

H. 知的財産権の出願, 登録状況  
特になし