

平成 26 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

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

分担研究者	荻原 博和	日本大学生物資源科学部
研究協力者	阿部 申	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：牛の肝臓は病原菌に汚染している可能性が高く、生食するためにはこれらの病原菌の除去や殺菌が必要とされている。そのため生食を可能にするためには、これらの病原菌の除菌や殺菌を行い、肝臓の生の食感を残しつつ、感染リスクの低減をはかる必要がある。

牛の肝臓における病原菌からの感染リスクを減少するために、現在の技術では非加熱殺菌処理技術が有望とされている。初年度はこれらの技術の中から高圧処理技術（静水圧）を利用することで牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化について検討した。その結果、高圧処理 400 及び 500MPa の圧力は、有効に *E.coli* を不活化させる効果を確認できたが、牛肝臓が特殊な色合いと食感を持つことから、これらの高圧処理を行うと本来がもっている生のレバーの食感が損失することが明らかとなった。

そこで本年度は、400 及び 500Mpa の高い静水圧ではなく、比較的低い圧力 250MPa に注目し処理時間を延長することで、低圧力で肝臓中の病原菌を不活化させる効果について検討を行った。

#### A. 研究目的

食肉の中でも肝臓は病原菌に汚染している可能性が高く、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラ、リステリア、E 型肝炎ウイルス等が検出されている。食肉に関連した食中毒事例も毎年報告されており、これらの事例においてはごく少量でも感染する腸管出血性大腸菌やカンピロバクター - などによるものが多くを占めている。したがって、これらの食中毒を防止するためには十分な加熱による調理と取り扱いの衛生管理が重要であることが知られている。しかし、加熱処理は病原菌の殺菌には非常に有効であるが、その食材は熱により変性することが知られている。肝臓等を生食するためには、これらの病原菌の殺菌や除菌処理が必要となる。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処理技術が必要である。

加熱処理を伴わない有効な殺菌技術としては、放射線、高電圧パルス、パルス光、高圧殺菌等の非加熱殺菌技術が存在している。なかでも静水圧を利用した高圧処理は、非加熱のため加熱による熱変性がなく、生の食材の香り、色、風味が保持されることが特徴である。さらに高圧処理により微生物も不活化するメリットもあることから病原菌のリスク低減に有効と考えられている。

本分担研究では、前年度より「高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する研究」を進めており、非加熱処理技術の高圧処理により細菌の不活化データの構築を進めている。昨年度

は高圧処理による検討では、400MPa 及び 500MPa の圧力が、*E. coli* の不活化に有効なデータを得ることができたが、一方で肝臓の肉色及び肉質変化が著しいことが明らかとなった。

そこで本年度は、静水圧の圧力が高い 400 及び 500MPa ではなく、比較的低い圧力の 150 ~ 250Mpa による食品媒介病原細菌の不活化の検討を行った。さらに肝臓中に接種した *E. coli* の不活化効果とその高圧処理が肝臓の肉色と肉質に及ぼす影響について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 高圧処理の 250MPa と圧力時間が *Escherichia coli* と *Salmonella Typhimurium* に及ぼす死滅効果

#### (1) 供試菌株

実験に供した菌株は代表的な *E. coli* ATCC 25922 と *S. Typhimurium* IID 1000 を用いた。なお、-80 に保存してある菌株を取り出し、TSB 培地を用いて 37 で 2 代継代培養したものを実験に供した。

#### (2) 高圧処理における *E. coli* と *S. Typhimurium* の測定法

*E. coli* と *S. Typhimurium* の培養液は、8000rpm、10min の遠心分離を行い、その上澄みを除去した後に、pH7.0 のリン酸緩衝液に置換した。再び同様に遠心分離を行い、リン酸緩衝液に置換した。さらに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グレイナー製のアンフルに充填した。これらの充填されたアンフルは高圧処理の試料とした。高圧処理後、アンフルから試料懸濁液を取り出し、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 で 24 時間培養し、発育した集落を計測した。

#### (3) 高圧処理装置と処理方法

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 *E. coli* と *S. Typhimurium* は 250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行った。なお、加圧媒体は精製水で処理を行った。

### 2. 高圧処理における食品媒介病原細菌の死滅効果の検討

#### (1) 供試菌株

実験に供した菌株は *E. coli* 及び食品媒介病原細菌として *S. Typhimurium*、*Salmonella Enteritidis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Cronobacter sakazakii*、*Providencia alcalifaciens*、*Yersinia enterocolitica* の計 7 菌株を用いた。なお、-80 に保存してある菌株を取り出し、TSB 培地を用いて 37 及び各菌株の至適温度で 2 代継代培養したものを実験に供した。

#### (2) 高圧処理における食品媒介病原細菌の測定法

各菌株の培養液は、8000rpm、10min の遠心分離を行い、その上澄みを除去した後に pH7.0 のリン酸緩衝液にて置換した。再び同様に遠心分離を行い、リン酸緩衝液に置換した。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グレイナー製のアンフルに充填した。これらの充填されたアンフルは高圧処理の試料とした。高圧処理後、アンフ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。

#### (3) 高圧処理装置と処理方法

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 *E.coli* 及びその他の食品媒介病原細菌は 250MPa で 180 分処理を行った。なお、加圧媒体は精製水で処理を行った。

### 3. 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

#### (1)供試菌株

実験に供した菌株は *E. coli* を用いた。なお、-80 に保存してある菌株を取り出し、TSB 培地を用いて 37 で 2 代継代培養したものを実験に供した。

#### (2)試料

牛の肝臓は東京都品川区にある芝浦屠場より購入した。研究室に搬入するまでは保冷バックに入れて搬入した。

#### (3)試料の調製

2 代継代した *E. coli*  $10^8$ CFU/mL の菌液を使用した。牛の肝臓を「横 2cm×縦 3cm、厚さ 0.5cm 程度・重量 10g」の長方形にカットされたブロックに、*E. coli* の菌液を等間隔 10 カ所に合計 100  $\mu$ l を接種した。接種した肝臓はプラスチックバックに入れてシールを行い、さらに同様に包装して、二重の密封状態にして高圧処理用の試料を作製した。

#### (4)高圧処理

高圧処理装置は、高圧ポンプ、ヨークフレム、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。

プラスチックバックの試料は高圧処理装置にセットし、加圧条件は 250MPa で 60 分、120 分、180 分の加圧処理を行った。

#### (5)生残菌数の測定

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(日水製薬社製)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。

### 4. 高圧処理における肝臓の肉色と硬さの検討

#### (1)供試試料

実験に用いた牛の肝臓は、東京都品川区にある芝浦屠場より入手した。研究室に搬入するまでは保冷バックに入れて搬入した。

#### (2)試料の調製

牛の肝臓を「横 2cm×縦 3cm、厚さ 0.5cm 程度・重量 10g」の長方形にカットされたブロックは、プラスチックバックに入れてシールを行い、さらにさらに同様に包装して、二重の密封状態にして高圧処理用の試料を作製した。

#### (3)高圧処理条件

プラスチックバックに密封された試料は、3.(4)に準じて高圧処理条件 250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行った。

#### (4)肝臓の肉色と肉質の変化

高圧処理後の肉色の変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した。

なお、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：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：サン科学社製のレオメーター、CR-3000EXを用いて行った。

肝臓の肉質の変化を硬度 (kgf/mm<sup>2</sup>) で測定した。

## C. 結果

### 1. 高圧処理の圧力と時間が *E.coli* と *S. Typhimurium* に及ぼす死滅効果

リン酸緩衝液に懸濁した *E.coli* と *S. Typhimurium* における高圧処理 150MPa, 200MPa, 250MPa と処理圧力時間 60分、120分、180分の結果を Fig. 1 及び Fig. 2 に示した。

高圧処理前のアンプル中の *E.coli* 未処理の菌数は 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。次に 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。

さらに *S. Typhimurium* でも同様に実験を行ったところ、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。*S. Typhimurium* は *E. coli* よりも高圧による影響を強

く受ける傾向が認められ、*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た。

以上の結果、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。

### 2. 高圧処理における食品媒介病原細菌の死滅効果の検討

次に前実験の結果を踏まえ、他の食品媒介病原細菌に対する 250MPa で 180分処理を行った結果を Fig. 3 に示した。

各食品媒介病原細菌の未処理での菌数は、約 8 ~ 9 log CFU/mL であった。これらの菌液をアンプルに封入して 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、未処理の菌数と比較して 5 オ - ダ - 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。

### 3. 牛肝臓に接種した *E.coli* の高圧による死滅効果の検討

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、次に牛肝臓に *E. coli* を接種し、高圧処理 250MPa、60分、120分、180分処理による肝臓中の *E. coli* の不活化を検討した結果を Fig. 4 に示した。

高圧未処理の肝臓からは生菌数及び *E. coli* 数は  $7 \log \text{CFU/g}$  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 2D の減少が認められた。さらに 180 分では生菌数で 3D、*E. coli* で 2D の死滅が認められた。これらの結果はリン酸緩衝液に懸濁して処理した結果より殺菌効果が劣る結果であった。今後は他の菌株や条件により異なることも考えられることからより詳細な検討並びにデ - タの構築が必要と考えられた。肝臓には高圧処理に対して保護効果や保護物質の存在の影響がある可能性も考えられた。

#### 4. 肝臓の色調と硬さに及ぼす高圧処理と処理時間の影響

高圧処理 250MPa で 60 分、120 分、180 分処理による肝臓の肉色の変化を色彩色差計で測定した結果を Table 1 に、写真を Fig. 5 に示した。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。

次に高圧処理における肝臓の硬さの変化を Table 2 に、写真を Fig. 6 に示した。肝臓の肉質は柔らかい傾向があるが、高圧処理を行うと硬さが増加することが前回の実験で判明している。そこで、今回はレオメーターを用いて肝臓の硬さについて検討を行った。肝臓の硬さは、硬度の数値で

示した。未処理の状態では  $0.0152 \pm 0.0068 \text{ kgf/mm}^2$  を示し、250MPa では 60 分処理を行うと  $0.0246 \pm 0.0046 \text{ kgf/mm}^2$ 、120 分処理では  $0.0249 \pm 0.0048 \text{ kgf/mm}^2$ 、120 分処理では  $0.0343 \pm 0.0088 \text{ kgf/mm}^2$  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。

Table 3 に高圧処理による肝臓の目視及び触感の結果を示した。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

前年度に引き続き高圧処理による牛肝臓中の *E. coli* の不活化を検討した。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。このような結果から、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る。一方、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、肝臓(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の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分処理の高圧処理は、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

高圧処理の250MPaで180分処理は、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、色いや硬さの面で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ータの構築が必要で、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

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

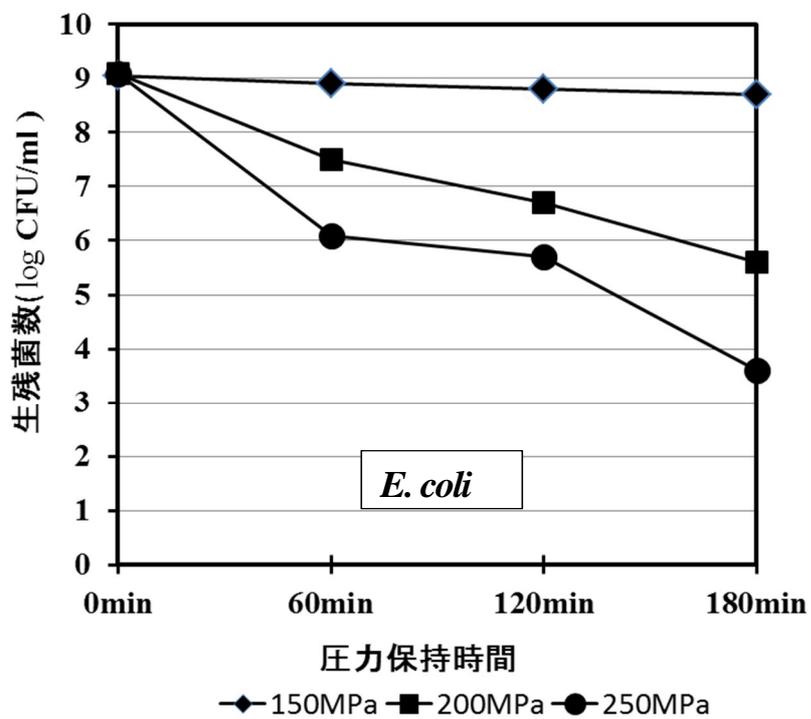


Fig. 1 高圧処理の圧力と時間が *E. coli* の死滅に及ぼす影響

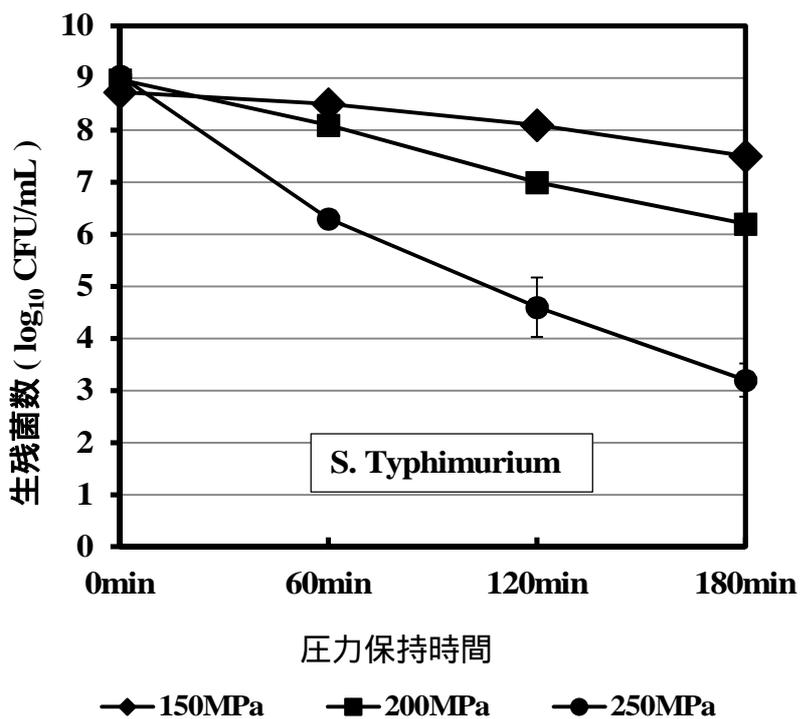
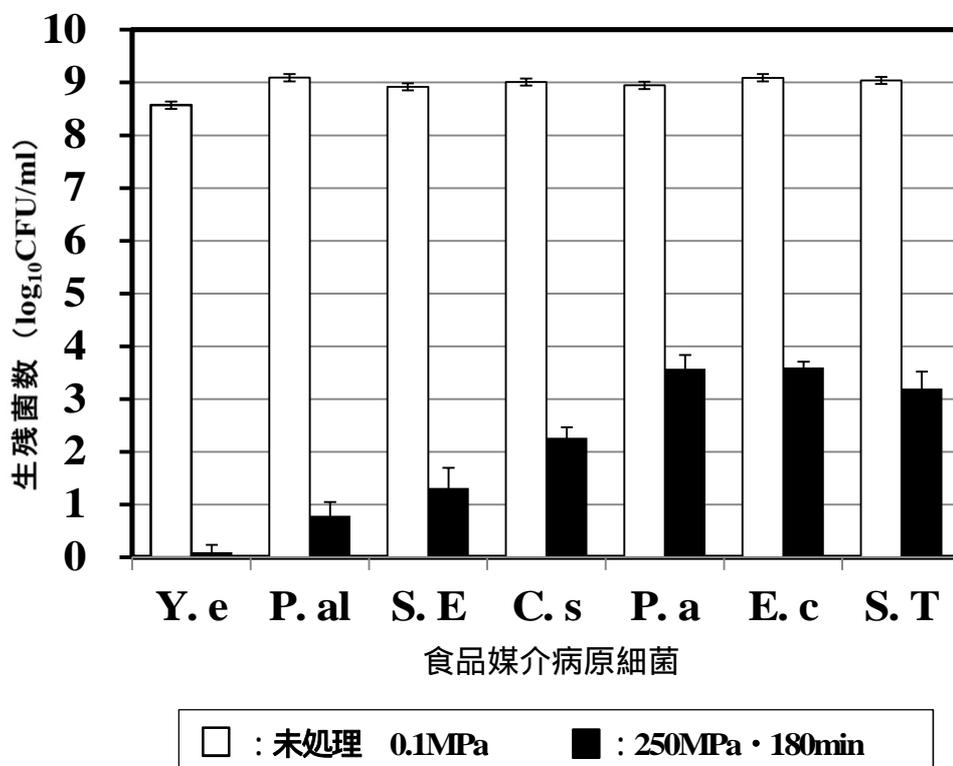


Fig.2 高圧処理の圧力と時間が *S. Typhimurium* の死滅に及ぼす影響



Y.e : <i>Yersinia enterocolitica</i>	P. al : <i>Providencia alcalifaciens</i>
S. E : <i>Salmonella Enteritidis</i> ,	C. a : <i>Cronobacter sakazakii</i> ,
P. a : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	E. c : <i>Escherichia coli</i>
S. T : <i>Salmonella Typhimurium</i>	

Fig. 3 高圧処理が食品媒介病原細菌の死滅に及ぼす影響

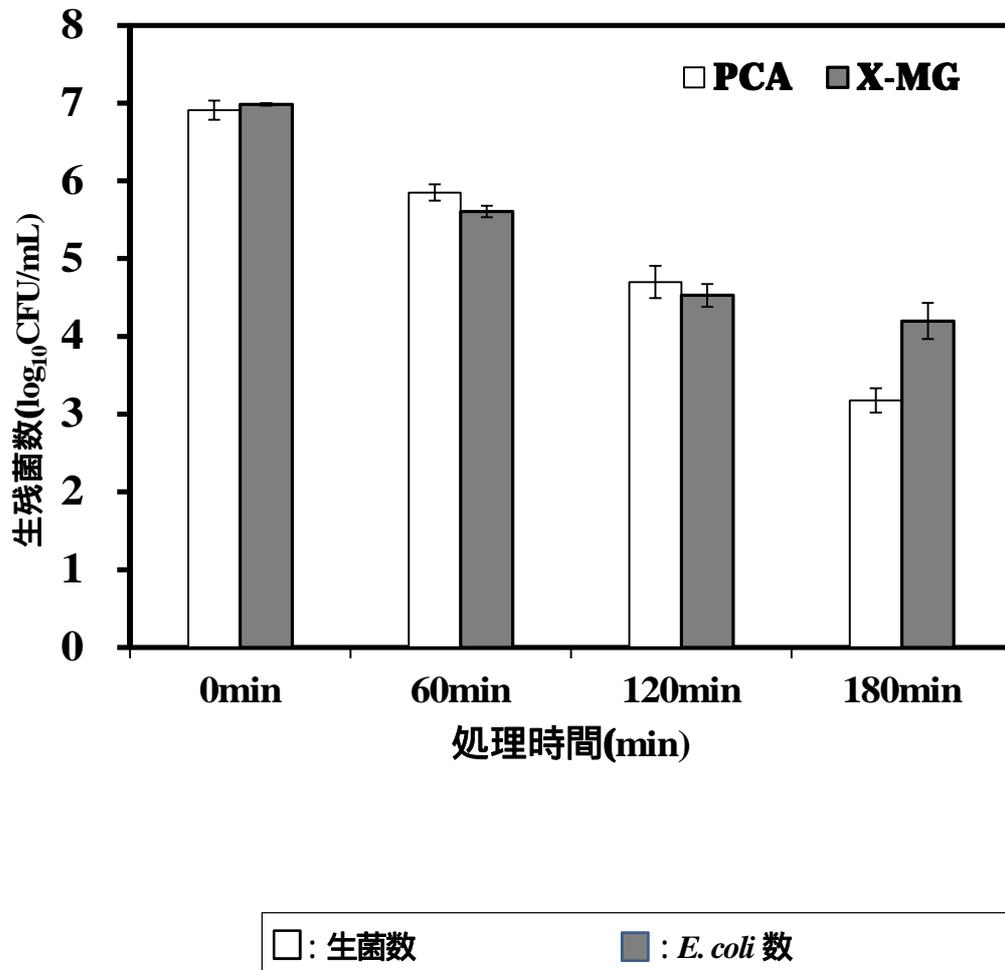
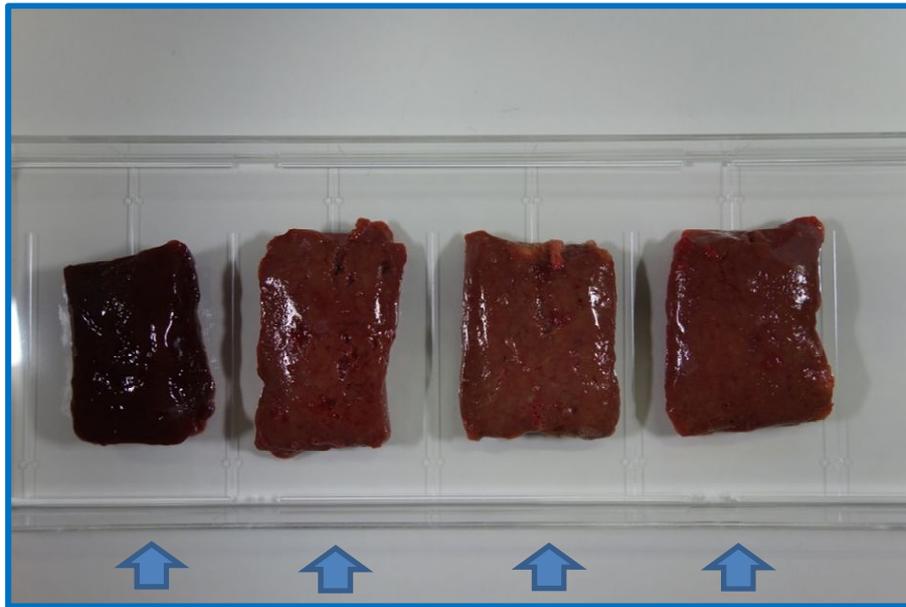


Fig. 4 肝臓に接種した *E. coli* の高圧処理による死滅効果



0.1MPa	60min	120min	180min
	250MPa	250MPa	250MPa

Fig. 5 高圧処理の圧力と時間が肝臓の肉色に及ぼす影響

Table 1 高圧処理の圧力と時間が肝臓の色差に及ぼす影響

圧力条件 (時間)	L 値	a 値	b 値
0 min	34.14±0.93	9.50±0.23	4.43±0.50
60 min	41.74±0.48	16.17±0.51	7.04±0.79
120 min	43.33±1.17	15.71±0.93	7.18±1.26
180 min	45.68±0.95	14.29±0.38	7.21±0.62

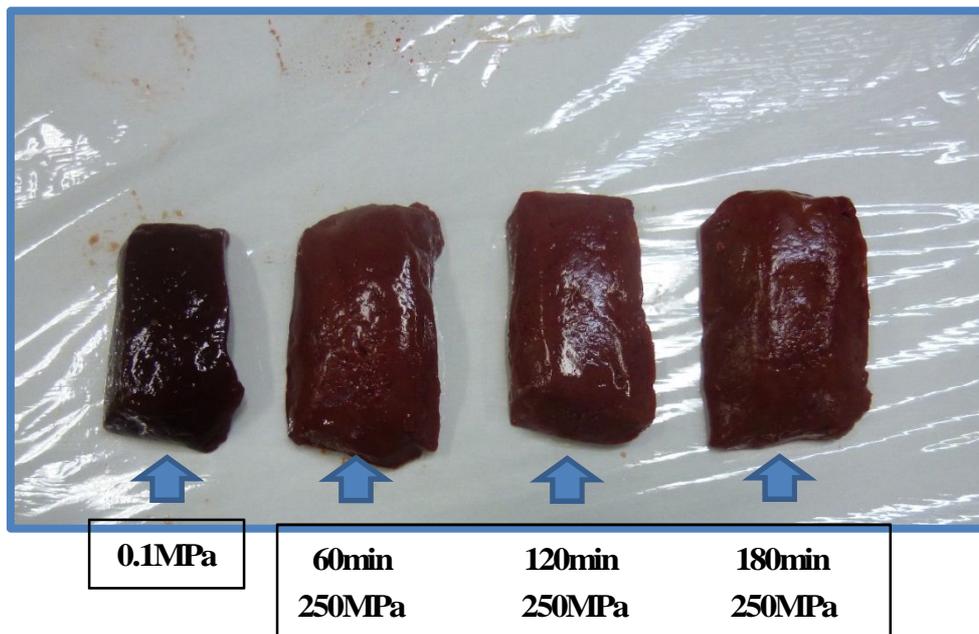


Fig 6 高圧処理の圧力と時間が肝臓の肉質に及ぼす影響

Table 2 高圧処理の圧力と時間が肝臓の硬さに及ぼす影響

圧力条件(時間)	最大荷重(g)	硬度 (Kgf/mm <sup>2</sup> )
0.1Mpa · 0min	<b>247.73±139.92</b>	<b>0.0153±0.0068</b>
250MPa · 60min	<b>469.97±127.61</b>	<b>0.0246±0.0046</b>
250MPa · 120min	<b>523.33±156.63</b>	<b>0.0249±0.0048</b>
250MPa · 180min	<b>670.33±124.42</b>	<b>0.0343±0.0068</b>

Table 3 高圧処理 (250MPa) による肝臓の色と硬さの変動

圧力条件(時間)	肉色	柔らかさ・硬さ
0.1Mpa・ 0min	鮮明な赤褐色	柔らかい
250MPa・ 60min	やや鮮明な赤褐色	やや柔らかい
250MPa・ 120min	やや鮮明な赤褐色	やや柔らかい
250MPa・ 180min	やや鮮明な赤褐色	やや柔らかい