

肉胞子虫は *Sarcocystis fayeri* とされている。患者喫食馬肉や単離した *S. fayeri* のシストを用いた分析から、ブラディゾイト中に含まれるタンパク質が、直接の下痢誘発物質として同定された(2)。

*S. fayeri* はイヌあるいはイヌ科の動物を終宿主、草食動物であるウマを中間宿主とする住肉胞子虫である(3-5)。終宿主から排泄されたスポロシストが牧草等を汚染する。ウマが牧草を食べる際にスポロシストが取り込まれ、メロゴニーが誘発され、その後、長さ1 cm前後、幅1 mm前後のシストを筋組織に形成する。シストを含んだ馬肉を終宿主のイヌあるいはイヌ科動物が捕食すると、シストは胃を通過し、腸内でブラディゾイトを放出する。腸管上皮細胞に侵入したブラディゾイトは、その後ガメトゴニーを経、ザイゴート、その後オーシストを形成し、スポロシストとして排泄される(5)。

厚生労働省が馬肉中の住肉胞子虫を検査する方法を通知している。住肉胞子虫の18S rRNA 遺伝子を標的とした遺伝子検査と、顕微鏡を用いた検査法で、遺伝子検査は、定性法として、以下のように実施する。馬肉サンプルから肉片を3か所切り出し、刃物でミンチ状にする。0.3 g のミンチを採取し、TE Buffer で1 ml にメスアップ、30秒間激しく攪拌し、3000 rpm で5~6秒間、遠心分離をする。上清200 µL を採取し、市販のDNA抽出キットを用いてDNAを抽出する。市販のPCR用試薬キットを用いて、定性PCR陽性対象と抽出DNAの定性PCRを行い、結果をアガロース電気泳動によって確認する。住肉胞子虫18S rRNA 遺伝子を検出する定性PCR法である。rRNA はRNA の一種であり、その塩基配列が種の同定や分類に利用されている。定性PCR陽性対象において約1100 bp の遺伝子増幅を確認し、検体DNAサンプルで遺伝子増幅が見られた場合、定性PCR陽性と判断する。

上述したように、住肉胞子虫は、草食動物と肉食動物で寄生環が維持されている(図1)。家畜も例外なく住肉胞子虫の寄生を受ける。

ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジにそれぞれ、固有の住肉胞子虫と、それら胞子虫が次世代を作る終宿主が明らかになっている(表1)。馬肉食中毒の原因が住肉胞子虫であることが明らかになった後、食中毒危害性の観点から、ウシにおける住肉胞子虫寄生状況を調べた報告がある(6)。岐阜県のと畜場での成績であるが、分離したシストの形態情報と、18S rRNA 遺伝子の塩基配列解析から、分離した住肉胞子虫が *S. cruzi* であることを確認後、顕微鏡検査によって、乳廃用牛ホルスタイン種53頭、肥育牛黒毛和種56頭、交雑種62頭が調べられた。検査部位は心筋で、実体顕微鏡および薄切切片のヘマトキシリン・エオシン(HE)染色標本中にシストが確認できればシスト陽性とし、HE染色標本では、シストの個数も計数している。シスト陽性率は、乳廃用牛94.3%、肥育黒毛和種牛53.6%、交雑種32.3%となっている。標本中の *S. cruzi* は、上述した毒性タンパク質の抗体で染色され、*S. cruzi* は、*S. fayeri* が持つ毒性タンパク質と免疫学的に交差性のあるタンパク質を保有することを明らかにしている。心筋における *S. cruzi* の汚染頻度は高く、また、毒性タンパク質が保有されていることから、*S. cruzi* の危害性を明確化する必要がある。一方、海外のウシにおける *S. cruzi* の寄生について文献を検索したところ、*S. cruzi* が寄生した牛肉の喫食が原因と断定された食中毒は報告されていない。また、*S. cruzi* の病原性の強さに関する報告もなされていない。

本年度は、牛の可食部やその他の部位の肉について、住肉胞子虫の遺伝子検査法を適応し、*S. cruzi* の汚染状況を調査し、牛肉の、住肉胞子虫による危害性を調査する際の方法論を整備することを目的とする。

## B. 研究方法

### B-1. 牛肉における住肉胞子虫検査

平成25年11月中に、岩手県食肉衛生検査所に病畜として搬入されたウシ6頭を用いた。ウシの品種はホルスタイン種で、月齢は44~

101 ヲ月齡、すべてメスで、岩手県産である。各牛からそれぞれ筋肉 8~9 ヲ所、計 52 ヲ所を採材した。

採取部位は、心筋、横隔膜筋、咬筋、ネック、カタ、リブローズ、ヒレ、モモ、舌を選出した。

#### 1) 組織標本中の住肉胞子虫検出

材料 1 検体あたり 2 x 2 x 2 cm のブロックを切り出し、10%中性ホルマリン緩衝液で固定した。固定したブロックについて、筋肉の走行に垂直に切り出し、常法に従ってパラフィン包埋した。薄切し、HE 染色を施した。染色後の切片 1 x 1 cm 中の、住肉胞子虫シストを計数した。住肉胞子虫のシストは、内部に、ヘマトキシリンに染まるブラディゾイトを多数含んだ袋状の構造物として検出される。

#### 2) 住肉胞子虫遺伝子検査法

厚生労働省が通知した、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法(7)を参照した。採材した肉検体から 0.3 g を取り出し、ミンチ状とした。ミンチを 1.5 ml のエッペンチューブに移し、TE 緩衝液を加えて 1 ml とした。チューブを 30 秒間激しく振盪させた。卓上の遠心分離器を用いて 3,000 rpm で約 10 秒間遠心分離し、上清を回収した。この軽度の遠心分離によって、肉片は沈殿し、ミンチ中に含まれるブラディゾイトあるいはシストは、上清に回収される。0.2 ml の上清から、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて、DNA を抽出精製した。

以下の方法で、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子を標的とする DNA 断片の増幅と、アガロースゲル電気泳動を行い、住肉胞子虫の定性 PCR 法による試験を行った。

プライマーは厚生労働省通知のものを用いた。PCR 条件も含め、表 2 に記載した。用いた試薬は 10x Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa)である。得た PCR 産物について、研究室保有の *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子増幅断片陽性コントロールとともに、Mupid-2 plus (ADVANCE) でアガロースゲル(2%)電気泳動を行った。DNA サ

イズマーカには 100bp plus DNA ladder (BIO CRAFT)を、検体の添加には 6x GR Green Loading Buffer (BIO CRAFT)を用いた。電気泳動後、イルミネーター (TYPE-FX II、ATTO)で結果を観察した。陽性の判断基準として、約 1,100 bp の遺伝子増幅産物が確認されることとした。

#### B-2 住肉胞子虫毒性タンパク質の検出

*S. fayeri* が持つ下痢誘発毒性タンパク質に対する抗体を用いて、検査筋肉中のシストの、免疫学的交差性のある毒性物の存在を検証した。同抗体は、国立医薬品食品衛生研究所でウサギを用いて作成されたポリクローナル抗体で、*S. fayeri* 虫体から分離された 15kDa タンパク質への抗体を示している。

上に記載したパラフィン切片について、脱パラフィンし、抗毒性タンパク質抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Sigma)、および発色剤としてペルオキシダーゼ染色 DAB キット Brown Stain (ナカライテスク)の順で反応させた。封入後、光学顕微鏡下で、陽性の指標として褐色反応があるかどうか確認した。

#### C. 研究結果

##### C-1 牛肉中の住肉胞子虫顕微鏡検査

咬筋の薄切 HE 染色標本中に、エオシンに強く染まる筋線維のなかで、同じくエオシンに染まるシスト壁に囲まれ、ヘマトキシリンに強く染色される構造物を認めた。同構造物はブラディゾイトを包有した住肉胞子虫のシストと判定された(図 2)。シストの形態は *S. cruzi* を推定させた。

##### C-2 抗 *S. fayeri* 毒性タンパク質抗体を用いた住肉胞子虫シストに対する免疫組織学的検証

咬筋のパラフィン切片標本を脱パラフィンし、抗毒性タンパク質抗体で処理した。光学顕微鏡で観察したところ、前述の、住肉胞子虫のシストと認識される構造物が、褐色に染

色された。シストを観察すると、褐色に染色されるのはシスト内の多数の構造物であり、ブラディゾイトが染色されていた。この染色状態は、これまで報告されている馬肉 (1)、および牛肉 (心筋) (6) と同一だった。以上の結果は、馬に寄生する *S. fayeri* が持つ下痢誘発毒性タンパク質と免疫学的に交差する物質が、ウシに寄生している住肉胞子虫にも存在すること、また、心筋だけでなく咬筋を寄生部位とする住肉胞子虫にも同タンパク質が存在する可能性が高いことを示している。また、咬筋に寄生する構造物が、*S. cruzi* であることを裏付ける。

#### C-3 顕微鏡下で計数した牛肉中住肉胞子虫シスト数

6頭の牛の9部位における、住肉胞子虫のシストを計数した (図3)。6頭の牛のいずれかの部位に、住肉胞子虫シストを確認した。シストが最も効率に検出されれば部位は心筋で (100%)、次に横隔膜筋および咬筋 (83.3%) だった。9カ所すべての部位からシストが検出されたのは6頭のうち、2頭だった。

シストの数を測定した。個体によって変動がみられたが、心筋では、1 cm<sup>2</sup> 当たりの平均シスト数は、0.1 から 3.5 を示した。心筋が最もシスト数の多い部位だった。次にシストが多く観察された部位はヒレで、以下ネック、舌と続いた。

#### C-4 牛肉中の住肉胞子虫遺伝子検査

ウシの筋肉各部位から抽出した DNA をテンプレートとして、住肉胞子虫遺伝子検出操作を実施した。住肉胞子虫遺伝子用の PCR の条件は馬肉について検討されたものであるため、馬肉より抽出した *S. fayeri* 虫体から抽出した DNA を陽性対象とした。図3に示すように、30 サイクルの PCR で、*S. fayeri* 由来 DNA では、約 1,100 bp の位置に非常に明瞭な DNA 断片のバンドを検出した。陽性対象ほどではないが、ウシのネック部、横隔膜、舌からの DNA について、約 1,100 bp の DNA の増

幅が確認された。DNA サイズが同様に、明確にバンドが検出されたことから、食中毒診断を目的としての馬肉中の住肉胞子虫 (*S. fayeri*) を対象とした遺伝子定性検査法は、牛肉より抽出した DNA への応用が可能であると判ぜられた。

#### C-5 牛肉中の住肉胞子虫検出に関する顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果の相関

顕微鏡下による住肉胞子虫シストの確認と、同一筋肉部位から抽出した DNA をテンプレートとした、住肉胞子虫遺伝子検査結果の相関を検討した。表3にその結果をまとめた。顕微鏡下で陽性だった 38 検体のうち、遺伝子検査陽性だったのは 20、陰性は 18 だった。顕微鏡下でシストが確認できなかった 14 検体については、それらのうちの 7 検体から住肉胞子虫の遺伝子増幅が確認された。以上の結果は、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果が、大きくかい離することを示している。

#### D. 考察

現行の馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法を、牛肉に適用し、その妥当性を検討した。また、牛6頭の、各々8~9カ所の筋肉部位について、住肉胞子虫を検出する顕微鏡検査と遺伝子検査の両方を実施し、その検出率の優劣と相関を検討した。同寄生虫の寄生の程度について考察した。

現行の住肉胞子虫を顕微鏡下で確認する方法は、筋肉片の均質化液を光学顕微鏡で観察し、遊離してくるブラディゾイトを確認するか、実体顕微鏡を用いて筋肉片からシストを摘出してシストを確認、その後シストから遊出するブラディゾイトを確認するとなっている。この方法では、ブラディゾイトを検出するのに習熟した技術を要求され、顕微鏡検査を正當に行えない危険性がある。そのため、古典的で、かつ、手間暇を要求されるが、薄切切片を作製し、ヘマトキシリンに濃染するブラディゾイトの集団と、それらを取り囲むシストを光学顕微鏡下で確認する方法を採用

した。

牛の咬筋を観察したところ、明瞭なブラディゾイトの集団とそれらを取り囲むシストを確認した。シスト壁の構造から、検出した住肉胞子虫は *S. cruzi* と判定された。結果には示していないが、遺伝子検査で実施して得た PCR 産物の塩基配列を調べたところ、*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子と相同性があることが確認された。

同シストに対し、*S. fayeri* から分離された下痢誘発性毒性タンパク質への抗体による免疫染色を行ったところ、陽性反応が得られた。ウシについては、心筋において、毒性タンパク質を保有する *S. cruzi* の存在が報告されている。本研究では、咬筋においても下痢誘発性毒性タンパク質を有する *S. cruzi* の寄生が確認された。

牛の咬筋あるいは、可食部の筋肉の全てから、住肉胞子虫のシストが顕微鏡下で確認された。そのシスト数には多少があり、検出されない部位もあった。しかしながら、検査を行った6頭すべてにおいて、共通してシストが検出されなかった部位はなく、住肉胞子虫の危害について牛体の中で例外部位はないと考えるべきと推察する。

厚生労働省が通知する、馬肉を対象とした遺伝子検査法を牛肉に適用できるか検討した。馬肉から抽出した *S. fayeri* 虫体からの抽出 DNA と同様、牛の咬筋や舌から抽出した DNA をテンプレートに PCR を行ったところ、同じ DNA サイズのバンドが、牛由来 DNA でも明瞭に観察された。副次的なバンドも多少あるものの、検査結果の評価に支障はなく、馬肉における住肉胞子虫遺伝子検査法が、牛肉にも適用可能なことが確認された。

牛肉中の住肉胞子虫について、薄切切片でシストを確認する方法と、適用可能なことが明らかになった遺伝子検査法との相関を検討した。薄切切片でシスト陽性が確認された検体のおよそ半分しか遺伝子検査陽性とならなかった。さらに、薄切切片でシスト陰性となった検体の半分は、遺伝子検査陽性となり、

遺伝子検査結果と顕微鏡検査の結果が大きく離した。

筋肉の薄切切片を染色し、住肉胞子虫のシストを確認する方法の信頼度は高い。シストを1つでも確認できれば陽性を示すことができる。しかし、同法はブロック状の筋肉組織の、数  $\mu\text{m}$  における検査である。一方、遺伝子検査においても、DNA を抽出するのは検体のわずか 0.3 g に過ぎない。今回調査した牛肉、および食中毒の原因となった馬肉を顕微鏡で観察すると、住肉胞子虫のシストは、筋肉に均質に分布していなかった。一方、シストの中には、非常に多数のブラディゾイトが集合しており、住肉胞子虫の DNA は、筋肉のなかで極めて局在化している状態になっている。以上から、牛肉における住肉胞子虫の危害性を評価するには、現行の住肉胞子虫食中毒を診断する顕微鏡検査法および定性 PCR 法を改良する必要があると考える。

昨年度の馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法に関する検討で、定量 PCR の有用性を示した。また、DNA を抽出する検体量の増加、ならびにその均質化が検査結果のばらつきを少なくするのに有効であることを示した。*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列は、*S. fayeri* のそれと部分的に一致し、また、それぞれに固有の部分がある。それらを利用し、DNA 抽出のための牛肉の量を増やし、均質化した後に DNA を抽出すること、さらに、*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子をクローニング後、その標準 DNA と検量線を用いての定量 PCR 法を構築することが推奨される。

#### E. 参考文献

- 1) Harada, S., Furusawa, M., Tokuma, E., Matsumoto, K., Yahiro, S., Miyasaka, J., Morihiro, S., Kamata, Y., Watnabe, M., Irikura, D., Matsumoto, H., Sugita-Konishi, Y. Control Toxicity of *Sarcocystis fayeri* in Horsmeat by Freezing Treatment and Prevention of

Food Poisoning Caused by Raw Consumption of Horsemeat. Food Hyg. Safety Sci. 54, 198-203. 2013

- 2) Kamata, Y., Saitou, S., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, T., Inui, T., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y. A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. J. Food Prot. 77, 814-819, 2014.
- 3) 齊藤 守弘. *Sarcocystis fayeri* 感染馬肉による食中毒. 2012. 獣医疫学雑誌. 16, 114-125
- 4) 鎌田 洋一. *Sarcocystis fayeri* を含んだ馬肉による食中毒. 食品衛生研究. 61, 21-27. 2011.
- 5) 板垣 博、大石 勇監修: 最新家畜寄生虫病学、朝倉書店、東京、2009.
- 6) 松尾加代子、佐藤 宏: 岐阜県内でと畜された牛の住肉胞子虫調査、日獣会誌、65, 791-794, 2012.
- 7) *Sarcocystis fayeri* の検査法について (暫定版) - 厚生労働省 .

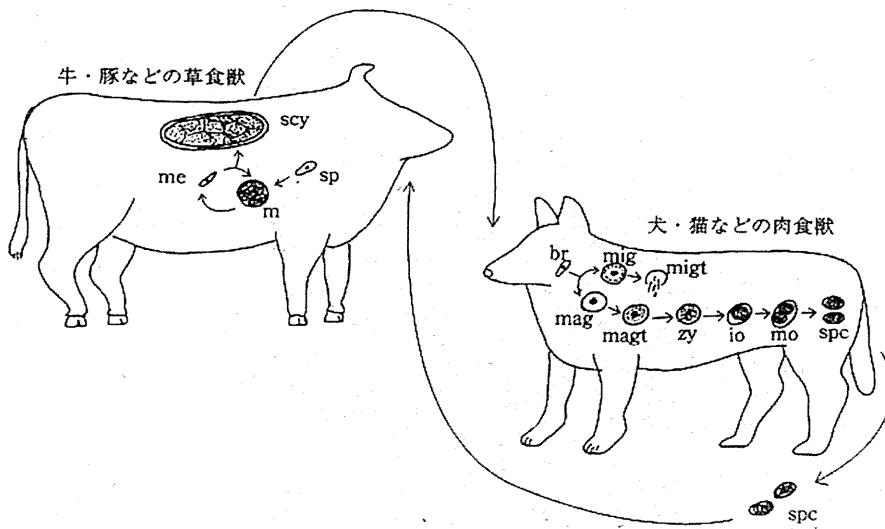
[http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110823\\_01.pdf](http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110823_01.pdf)

#### F. 研究発表

- 1) 鎌田洋一、わが国における寄生虫性食中毒の発生状況—厚生労働省食中毒統計からの解析—、食品衛生研究 65, 25-31, 2014.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案取得  
なし。
3. その他  
なし。



図II.41 サルコシステイス (*Sarcocystis*) の生活環

br : ブラディゾイト, io : 未成熟オーシスト, m : メロント, mag : マクロガモント, magt : マクロガメート, me : メロゾイト, mig : ミクロガモント, migt : ミクロガメート, mo : 成熟オーシスト, scy : サルコシスト, sp : スポロゾイト, spc : スポロシスト, zy : ザイゴート.

図1 住肉胞子虫の寄生虫環  
文献5) より引用

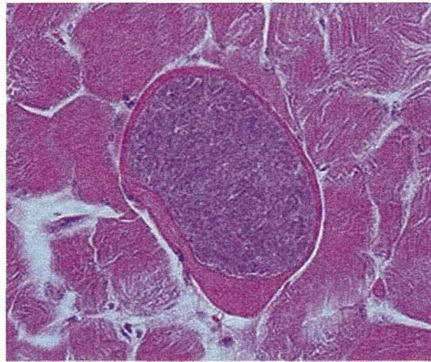


図2 牛咬筋のHE染色像

シストと、ヘマトキシリンに濃染されるブラディゾイトが確認される。

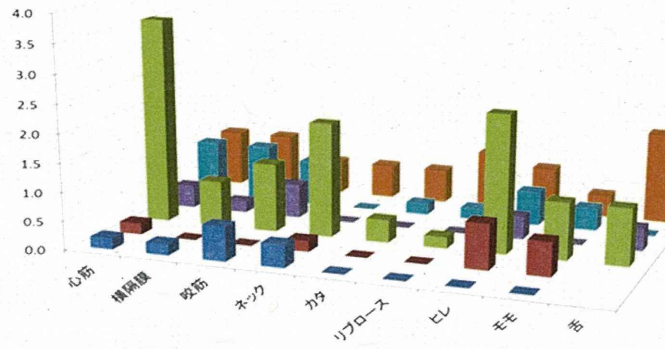


図3 牛6頭の筋肉各部位における住肉胞子虫シスト数

縦軸は顕微鏡下で計数した1 cm<sup>2</sup>当たりのシスト数を示す。各色は、牛の個体を示す。



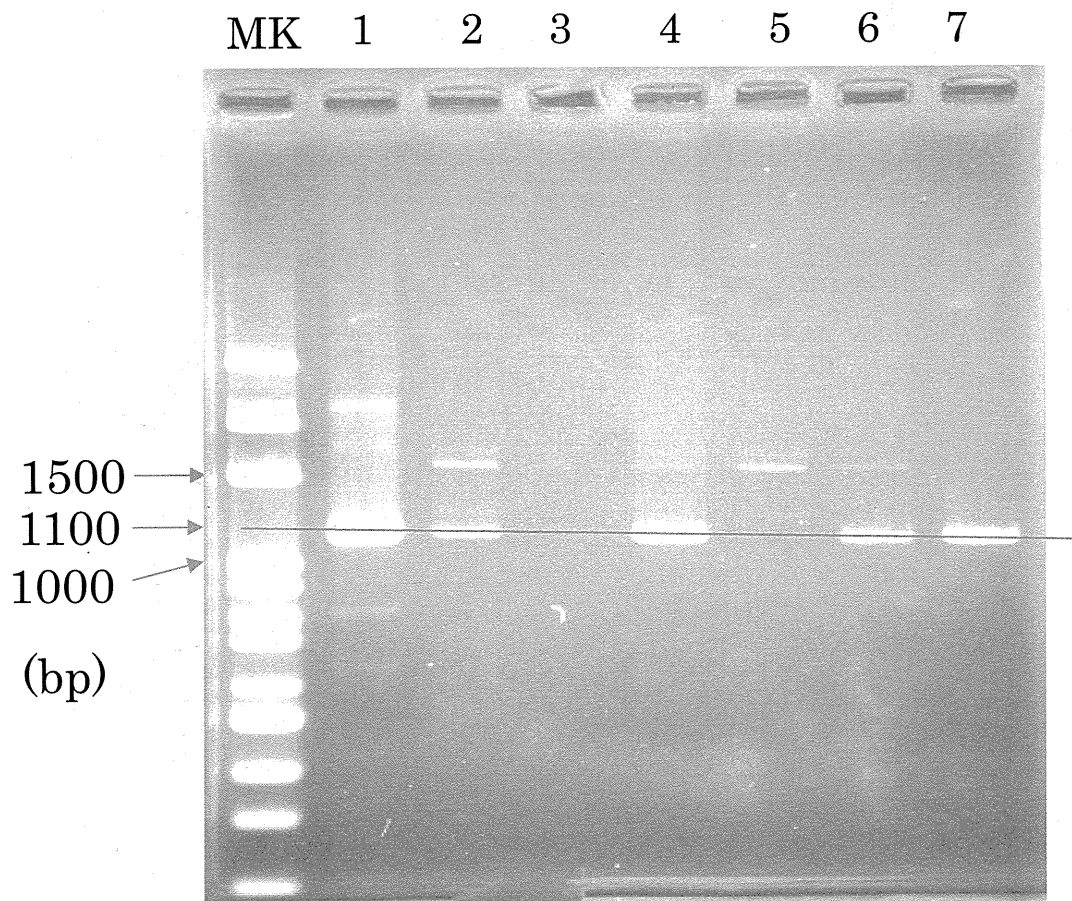


図4. 牛肉から抽出したDNAをテンプレートとした時の住肉孢子虫遺伝子検査

MK : DNA サイズマーカー

レーン1 ; 馬肉由来 *S. fayeri* シスト抽出DNA

レーン2 : 牛 ネック抽出DNA

レーン3 : 牛 咬筋抽出DNA

レーン4 : 牛 横隔膜筋抽出DNA

レーン5 : 牛 カタ抽出DNA

レーン6 : 牛 タン抽出DNA

レーン7 : 牛 タン抽出DNA

表1 *Sarcocystis* 属の宿主

中間宿主	<i>Sarcocystis</i> 属	終宿主
ウシ	<i>S. cruzi</i>	イヌ
	<i>S. hirsuta</i>	ネコ
	<i>S. hominis</i>	ヒト
ブタ	<i>S. miescheriana</i>	イヌ
	<i>S. porcifelis</i>	ネコ
	<i>S. suihominis</i>	ヒト
ヒツジ	<i>S. ovicanis</i>	イヌ
	<i>S. renella</i>	ネコ
ウマ	<i>S. bertrami</i>	イヌ
	<i>S. fayeri</i>	イヌ

表2 牛肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法：PCR条件

プライマー	
フォワード	5'-GGATAACCGTGGTAATTCTATG-3'
リバース	5'-TCCTATGTCTGGACCTGGTGAG-3'

PCR条件	
変性	94°C 3分
サイクル数	30
変性	94°C 30秒
アニーリング	60°C 60秒
伸長	72°C 60秒
伸長	72°C 5分

表3 牛肉中の住肉胞子虫検出における  
顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果の相関

顕微鏡検査	検体数	遺伝子検査	
		陽性	陰性
シスト陽性	38	20	18
シスト陰性	14	7	7

平成 27 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

分担研究者：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：牛の肝臓内に存在する大腸菌群及び腸内細菌科菌群を塩素系・非塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせて殺菌可能か種々の消毒薬を用いて、肝臓を 5 カ所（部位 1-5）あるいは 2 カ所（左葉 [部位 1 と 2] と右葉 [部位 3-5]）に分けて評価した。殺菌効果は消毒薬の種類によってかなり差があり、ある消毒薬では 40% で完全に腸内細菌科菌群が検出されなくなったのに対し、ある消毒薬では調べた全ての検体において腸内細菌科菌群が検出された。さらに、肝臓検体を増菌培養後 PCR 法で 2 種類の志賀毒素 (*stx1/2*) 遺伝子を検出したところ肝臓表面から *stx2* 遺伝子が検出されたが、5 つの部位を含め肝臓内部からはいずれの *stx* 遺伝子も検出されなかった。

A. 研究目的

牛肝臓内から腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）O157 が検出されたことから生レバーの喫食が禁止となった。一方、消費者からの生レバー復活に対する期待は大きい。現状の牛肝臓を生で食すると STEC 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 STEC を含む大腸菌群の汚染は胆管を経由していると仮定し、平成 25 年度、平成 26 年度に牛肝臓を 5 つの部位に分け大腸菌群の分布を調べた。その結果、部位 1 と 2（生食用として提供されていた部位）では陽性率が低く部位 3 から 5（生食用でなく加熱用として提

供されていた部位）で高いことがわかった。一方、夏場では大腸菌群の肝臓内での陽性率が高く、冬場では陽性率が低いことも明らかとなった。また、*stx* 遺伝子は部位 3-5 からは検出されたが、部位 1 と 2 からは検出されなかった。

本研究では、牛肝臓内に存在する腸内細菌科菌群の殺菌法の開発を目的とし、本年度は種々の塩素系・非塩素系消毒薬を胆管から肝臓内に注入し、凍結融解法と組み合わせた殺菌効果を検討した。さらに、牛肝臓の部位ごとの STEC の汚染状況を調べる目的で PCR 法にて *stx* 遺伝子の検出を継続して行った。

B. 研究方法

1. 牛肝臓内の大腸菌群の菌数と各種消

## 毒薬の殺菌効果の比較

### 1-1. 肝臓を5つの部位に分けた場合

屠畜解体直後に牛肝臓と胆汁を採取し、肝臓については、塩素系消毒薬 (A と E) と抗菌活性確認されている非塩素系消毒薬 (B、C、D) を胆管内に注入し肝臓内を洗浄、殺菌した。その後、図に示したように肝臓を5つの部位、すなわち生食用として提供されていた部位1と2、加熱用として提供されていた部位3から5に分け、それぞれの部位から約50g (2015年1月より3月まで) あるいは約100g (2015年4月より9月まで) を採取し、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。処理が不十分な場合は、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と胆汁をそれぞれ滅菌PBSで段階希釈し、得られた100 $\mu$ LをMacConkey寒天培地に植菌し、大腸菌群の菌数を測定した。そのうち部位1と2は、さらに25gの肝臓を採取し、-30 $^{\circ}$ Cで凍結融解後、同様の処理を行い、大腸菌群の菌数を測定した。さらに、BPW培地で増菌した培養液をVRBG寒天培地に植菌し37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。コロニーが得られなかった場合、さらに、EE培地で増菌培養を行いVRBG寒天培地に植菌し37 $^{\circ}$ Cで一晩培養後、腸内細菌科菌群の有無を判定した。

### 1-2. 肝臓を左葉、右葉で分けた場合

2015年10月より、肝臓を部位1と2に該当する左葉と部位3-5に該当する右葉に分け、それぞれ10カ所から5g、合計50gを採取して上記と同様に処置した。さらに、10カ所から2.5gずつ採取し合

計25gを-30 $^{\circ}$ Cで凍結融解後、上記と同様に処置した。

### 2. 肝臓内部、表面、胆汁と肛門組織からの *stx* 遺伝子の検出

1に記した方法と同様に肝臓検体を処理した後、TSBで増菌培養後、*stx1*と*stx2*を同時に検出できるマルチプレックスPCR法で*stx*遺伝子を検出した。尚、2015年1月から3月までは、50gの肝臓を、4月から9月までは100gの肝臓を取り出し、それぞれ等量のPBSを加え、ストマッカー処理を行なった後、1mLを1.25xTSB、4mLに加え37 $^{\circ}$ Cで一晩増菌培養した。2015年10月から12月までの検体は、50gの肝臓に50mLのTSBを加えストマッカー処理を行った。その後、TSBで総量250mLとなるようにメスアップし、37 $^{\circ}$ Cで一晩増菌培養した。それぞれの増菌培養液1mLを回収し、遠心分離後上清を捨てペレットに1mLのTEを加え、100 $^{\circ}$ C、10分間加熱処理した。遠心分離後、上清を回収し鋳型DNAとしてPCRに供した。

## C. 研究結果

### 1-1. 肝臓を5つの部位に分けた場合の大腸菌群の菌数と消毒薬の殺菌効果

2015年1月から9月までの間に調べた結果を表1にまとめた。消毒薬Aを肝臓内に注入した場合、生食用として提供されていた部位1と2での陽性率は26%と23%と、他の消毒薬の56-86%と比べ低かった。一方、加熱用として提供されていた部位3-5では、全体的に陽性率が高かった(70-100%)が、消毒薬Aでは菌の

陽性率は、50-60%と他の消毒薬と比較して低かった。

さらに、凍結融解を組み合わせた殺菌効果について調べた結果を表2に示した。凍結融解後2回増菌した場合、部位1と2とも60%で腸内細菌科菌群が検出された。言い換えれば、40%では腸内細菌科菌群が全く検出されないレベルであった。一方、消毒薬B、C、Dでは凍結融解後の大腸菌群の陽性率は33-60%であったが、2次増菌後の腸内細菌科菌群の陽性率は90-100%であった。さらに、消毒薬AとEの効果をより詳細に調べることを目的に、肝臓を生食用として提供されていた部位1と2を左葉、加熱用として提供されていた部位3-5を右葉に分けて、10カ所から採取した結果を表3にまとめた。腸内細菌科菌群の陽性率の低かった消毒薬Aを2つの濃度(2,000 ppmと500 ppm)で評価し、さらに別の塩素系消毒薬Eについても評価した。その結果、消毒薬Aが500 ppmの場合、右葉では凍結無しで100%大腸菌群が陽性であったのに対し、左葉では凍結無しで44%の陽性率であった。さらに、凍結融解後は陽性率が33%まで下がったが、2次増菌を行うと陽性率が89%まで上がった。2,000 ppmを用いた場合もほぼ同様の結果であった(表3)。一方、消毒薬E(400 ppm)を用いた場合、凍結無、凍結融解後の陽性率はそれぞれ8%、2次増菌後の陽性率は50%であった。

## 2. 肝臓内部、表面、胆汁及び肛門組織からの *stx* 遺伝子の検出

0.5 g/1.0 g 相当の増菌培養液から PCR

法で *stx* 遺伝子の検出を試みたところ、88 検体の肝臓内部、80 検体の胆汁からは *stx* 遺伝子は検出されなかった(表4)。一方、87 検体の肝臓表面から4 検体で *stx2* 遺伝子が検出された。最も汚染率が高い肛門組織を陽性コントロールとして81 検体調べたところ、64 検体から *stx1*、*stx2* 遺伝子のどちらか一方あるいは両方が検出された。さらに、50 g 相当となるように増菌培養した検体では、調べた48 検体全てで肝臓左葉と右葉、及び胆汁36 検体から *stx* 遺伝子は検出されなかった(表5)。肝臓表面からは調べた48 検体中、6 検体で *stx2* 遺伝子が、肛門組織からは調べた30 検体中、27 検体でいずれかの *stx* 遺伝子が検出された。

尚、0.5/1.0 g 相当の増菌培養液での検出下限は62 CFU/50 g、50 g 相当の増菌培養液での検出下限は6.2 CFU/50 g であった。

## D. 考察

昨年度までの研究で牛肝臓内の大腸菌群の分布は生食用として提供されていた部位1と2は、加熱用として提供されていた部位3から5と比べて汚染率が低く、また、胆汁の陽性率よりも肝臓内の汚染率の方が高いことが明らかとなった。その理由として、肝臓内の大腸菌群は、胆汁も汚染源の1つではあるがそれ以外にも汚染源がある可能性が考えられ、その1つが血管(門脈、静脈)であった。

本年度の研究では、種々の塩素系消毒薬と非塩素系消毒薬の肝臓内大腸菌群及び腸内細菌科菌群の殺菌効果について比較した。調べた検体数は必ずしも十分で

なく、また、季節性を考慮できていない点も含め今回の結果でどの消毒薬が最も優れているか結論づけることはできないが、消毒薬の種類によって効果に違いがあった(表1)。さらに殺菌効果を上げる目的で各種消毒薬と凍結融解を組み合わせることで評価したところ(表2)、消毒薬 A (2,000 ppm) を用いた場合、25 g の肝臓検体を BPW と EE-broth による 2 次増菌培養を行った後でも部位 1 と 2 の 40% で腸内細菌科菌群は全く検出されなかった。このことはロットによっては消毒薬 A (2,000 ppm) と凍結融解を組み合わせることによって検出される腸内細菌科菌群をゼロにできる可能性を示している。さらに詳細に調べる目的で、生食用として提供されていた部位 1 と 2 をまとめ左葉とし、加熱用として提供されていた部位 3 から 5 を右葉としてそれぞれ、2.5 g を 10 カ所から回収し同様の実験を行った。その結果、表 3 に示したように消毒薬 A (2,000 ppm、500 ppm とも) では凍結融解後の陽性率は下がったものの 2 次増菌後は約 90% で腸内細菌科菌群が検出された。消毒薬 E を用いた場合は、2 次増菌後の陽性率が 50% と最も良い結果が得られたが、調べた肝臓における汚染菌数も元々少なかった。凍結融解後に陽性となった 1 検体は胆汁中に  $10^7$  CFU/ml の大腸菌群が存在していたものであった。今後さらに殺菌効率を上げる為の検討、あるいは、事前に汚染菌数の高い検体を検出できる方法を開発し、汚染菌数の少ない特定の肝臓のみ殺菌する方法の開発が求められる。

一番問題となる STEC 汚染については、

今年度調べた限り牛肝臓内部から *stx* 遺伝子は検出されなかった。また 2 次増菌後の増菌培養液からも *stx* 遺伝子は検出されなかった。一方、牛肝臓表面からは *stx2* 遺伝子が検出された。肛門組織においても *stx2* 遺伝子の陽性率が高いことから、おそらく、屠畜解体時に牛の糞便を介して肝臓表面を汚染したものと考えられる。いずれにせよ、さらに検体数を増やして牛肝臓内部に STEC が混入しているのか、もし、混入するとすればどのような経路でどの部位が汚染するのかについて調べて行く必要がある。

#### E. 結論

牛肝臓内の大腸菌群及び腸内細菌科菌群の各種消毒薬と凍結融解を組み合わせた殺菌法は、用いる消毒薬の種類によってはある程度の低減効果は認められた。しかしながら、現状では十分でなく更なる検討が必要である。一方、STEC 汚染については、一部肝臓表面から *stx* 遺伝子が検出されたが、肝臓内から *stx* 遺伝子は検出されなかった。特に、生食用として提供されていた部位 1 と 2 では調べた 136 検体で *stx* 遺伝子は全く検出されなかった。今後さらに検体数を増やして、慎重に検証して行く必要がある。

#### F. 健康危機情報

牛の肝臓内から直接 STEC の存在は確認できなかったが、大腸菌群及び腸内細菌科菌群が検出され、また、塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせる方法で完全に殺菌できなかった。現状では、牛の肝臓内には大腸菌群の汚染率が高く、牛肝



臓を生で食べることは免疫力の弱い小児や老人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. 各種消毒薬処理後の部位ごとの肝臓内大腸菌群陽性検体数と陽性率

消毒薬	部位 1 (%)	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5	胆汁
A* [61#]	16 <sup>§</sup> (26)	14 (23)	34 (56)	31 (51)	38 (62)	11 (18)
B** [16]	12 (75)	11 (69)	14 (88)	16 (100)	16 (100)	4/15 <sup>#</sup> (27)
C*** [7]	5 (71)	6 (86)	5 (71)	7 (100)	7 (100)	0/4 (0)
D## [9]	5 (56)	6 (67)	7 (88)	9 (100)	9 (100)	0 (0)

調査時期：\*H27/1-H27/9, \*\*H27/5-H27/8, \*\*\*H27/6-H27/8, ##H27/8-H27/9

#総検体数、§陽性検体数

表 2. 各種消毒薬で処理後、凍結無、凍結有、凍結後 2 回増菌の細菌陽性検体数と陽性率

消毒薬	部位 1 (%)			部位 2		
	凍結無 <sup>+</sup>	凍結有 <sup>+</sup>	凍結 2 次増菌 <sup>&amp;</sup>	凍結無 <sup>+</sup>	凍結有 <sup>+</sup>	凍結 2 次増菌 <sup>&amp;</sup>
A* [30#]	13 <sup>§</sup> (43)	11 (37)	18 (60)	12 (40)	8 (27)	18 (60)
B** [16]	12 (75)	9 (56)	15 (94)	11 (69)	9/15 <sup>#</sup> (60)	15/15 <sup>#</sup> (100)
C*** [7]	5 (71)	4 (57)	7 (100)	6 (86)	4 (57)	7 (100)
D## [9]	5 (56)	3 (33)	9 (100)	6 (67)	3 (33)	8 (89)

調査時期：\*H27/4-H27/9, \*\*H27/5-H27/8, \*\*\*H27/6-H27/8, ##H27/8-H27/9

#総検体数、§陽性検体数、<sup>+</sup>大腸菌群細菌、<sup>&</sup>腸内細菌科菌群

表 3. 各種消毒薬処理後の肝臓内の部位ごとと胆汁における細菌陽性率

消毒薬	左葉：部位 1 と 2 (%)			右葉：部位 3-5	胆汁
	凍結無+	凍結有+	凍結 2 次増菌 &	凍結無+	凍結無+
A 500 ppm* [18#]	8 <sup>§</sup> (44)	6 (33)	16 (89)	18 (100)	6/14 <sup>#</sup> (43)
A 2,000 ppm* [22]	10 (45)	5 (23)	19 (86)	21 (95)	2/15 <sup>#</sup> (13)
E 400 ppm <sup>§§</sup> [12]	1 (8)	1 (8)	6 (50)	4 (33)	1/10 (10)

#総検体数、<sup>§</sup>陽性検体数、+大腸菌群細菌、&腸内細菌科菌群、\*H27/10-H27/12、<sup>§§</sup>H28/1

表 4. 肝臓内部、表面、胆汁及び肛門組織における *stx* 遺伝子の分布 (0.5 g/1.0 g 相当)

遺伝子	肝臓 [88#]					肝臓表面 [87]	胆汁 [80]	肛門組織 [81]
	部位 1 (%)	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5			
<i>stx1</i>	0 <sup>§</sup> (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3.7)
<i>stx2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4.6)	0 (0)	41 (51)
<i>stx1/2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (25)
合計	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4.6)	0 (0)	64 (79)

#総検体数、<sup>§</sup>陽性検体数

表 5. 肝臓内部、表面、胆汁及び肛門組織における *stx* 遺伝子の分布 (50 g 相当)

遺伝子	肝臓 (%)			胆汁 [36]	肛門組織 [30]
	左葉 [48#]	右葉 [48]	表面 [48]		
<i>stx1</i>	0 <sup>§</sup> (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10)
<i>stx2</i>	0 (0)	0 (0)	6 (13)	0 (0)	12 (40)
<i>stx1/2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12 (40)
合計	0 (0)	0 (0)	6 (13)	0 (0)	27 (90)

#総検体数、<sup>§</sup>陽性検体数

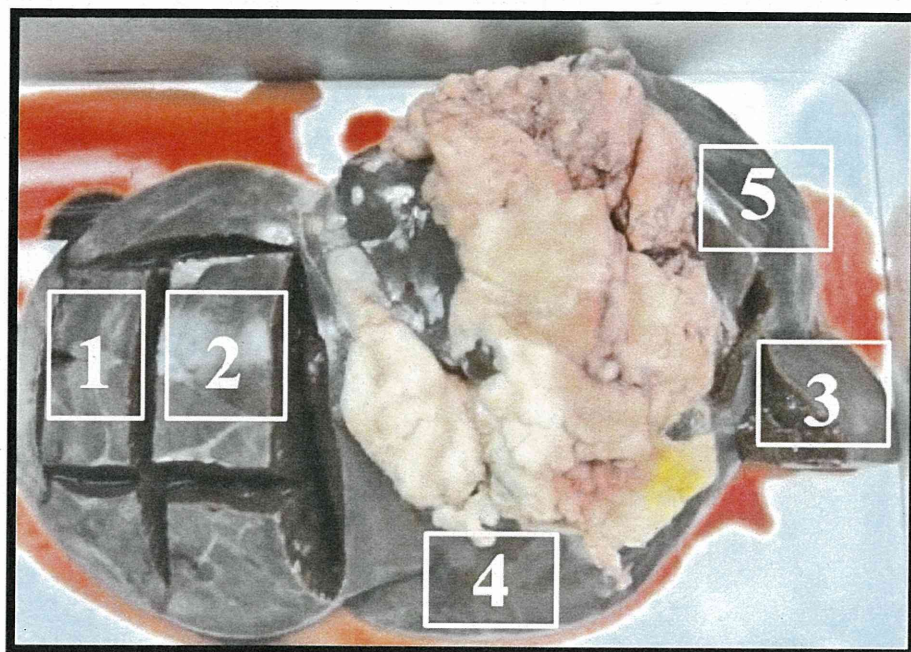


図. 肝臓から採取した部位1-5を示す、左葉（部位1と2）、右葉（部位3-5）

平成 27 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)

分担研究報告書

分担課題名 放射線照射による微生物除去

研究分担者：等々力 節子 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究所  
研究協力者：川崎 晋 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究所

研究要旨：牛肝臓内部に接種した *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株のガンマ線殺菌を行い、D<sub>10</sub> 値として、凍結 (-80°C) 含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy を得た。また、*Salmonella* を 10<sup>5</sup> CFU/g 接種した検体について、目標線量が、6、7、8 kGy となるよう 3 段階の線量のガンマ線を照射した場合、含気条件では 7、脱気条件では 8 kGy で *Salmonella* が非検出となった (n=5)。抽出法を変更して回収率を向上させた分析法により、冷凍(0°C) 6 kGy、凍結(-80°C) 10 kGy までの牛肝臓のガンマ線照射における、2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB の生成量を再確認した。

#### A. 研究目的

近年、食習慣の変化や高齢化などの社会状況の変化を反映し、わが国における細菌性あるいはウイルス性の食中毒の発生状況に変化が生じている。2011 年にはユッケを原因食材とする腸管出血性大腸菌による集団食中毒が発生し、それを契機に畜産物の生食による食中毒リスクが議論された。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が設定された。この規制には解除の要望も多かったことから、今後、生食の安全性を確保する新たな知見が得

られれば、必要な管理措置を改めて審議することも答申された<sup>1)</sup>。

そこで、放射線照射のような新たな微生物制御法についてもその有効性についての検討が必要となり、平成 24 年度より研究が開始された。

本分担研究課題では、前研究課題を継続して、放射線照射による牛肝臓の殺菌条件を明らかにし、その際に生成する副産物及びその安全性を検討することを目的とする。

本年度は、牛肝臓内部に接種した *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株の凍結条件でのガンマ線による死滅効果の確認と電子線照射に関する予備試験を実施した。また、照射による副生成物について、冷凍 10 kGy、冷蔵 6 kGy までの線