

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)

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

日本国内では近年、畜産食品の生食による健康被害が報告され、生食用牛肉の加工基準の設定、牛肝臓、豚肉等の生食用提供の禁止等の措置が取られてきた。本研究では平成 25 年より、畜産食品の生食リスクを明らかにし、その低減の可能性を検討することを目的として、研究を実施した。

本年度は、畜産食品の汚染実態として、牛 6 頭の肉及び内臓における住肉胞子虫の分布状況の調査を行った。その結果、心筋 6 検体 (100%)、ヒレ 5 検体 (83.3%) 等から住肉胞子虫のシストが検出された。また、厚生労働省が通知した馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査の方法が、牛検体においても応用可能であったが、顕微鏡による検査法の結果とのかい離もみられ、試験法の改善が必要と思われた。

牛肝臓表面及びその内部、胆汁及び肛門組織における志賀毒素遺伝子の検出を行ったところ、肝臓表面から *stx2* 遺伝子が検出されたが、胆汁及び肝臓内部からは *stx* 遺伝子は検出されなかった。

低減手法の検討は、消毒薬及び放射線照射による牛肝臓中の殺菌法と、高圧処理による鶏ササミ中の殺菌法について検討した。消毒薬を用いた殺菌法の検討では、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または非塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせる殺菌可能か、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。その結果、殺菌効果は消毒薬の種類によってかなり差があることが示された。

放射線照射による検討では、放射線抵抗性が高いことが確認された *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を牛肝臓内部に接種してガンマ線照射を行い、 D_{10} 値として、凍結 (-80) 含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy を得た。また、*Salmonella* を 10^5 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 kGy、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、氷冷 (0) 6 kGy、凍結 (-80) 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。

高圧処理による検討では、300MPa 5 分間の処理を 6 回反復する処理により、鶏ササミに接種した *S. Typhimurium* LT2 株が 2 ~ 5log の低減を示し、*Campylobacter jejuni*

NCTC11168 株では 7log 以上が低減して、定量法では検出限界以下となった。今回の処理条件により、肉色は白化する傾向を示した。サルモネラでは高圧処理後の発育集落数が選択分離培地と非選択培地上で異なっている場合が見られ、処理により損傷菌が発生していると思われた。また、高圧処理を行った牛肝臓の超微細形態学的変化について検討したところ、細胞質のミトコンドリア内部に球状の無構造な凝集物の蓄積や、核の周囲に存在する粗面小胞体の不明瞭化などの変化が認められた。このような変化は処理圧が高くなるほど顕著となった。これらの超微細形態学的変化は高圧処理による牛肝臓の硬さの変化と関連していると考えられた。

分担研究者：

等々力 節子 独) 農研機構 食品総合研究所

山崎 伸二 大阪府立大学大学院

鎌田 洋一 岩手大学

荻原 博和 日本大学

五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者：

川崎 晋 独) 農研機構 食品総合研究所

日根野谷 淳 大阪府立大学大学院

三井 太平 岩手県食肉衛生検査所

鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所

吉田 麻利江 国立医薬品食品衛生研究所

道下 正貴 日本獣医生命科学大学

畠山 仁 日本獣医生命科学大学

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、牛肝臓の生食用提供禁止及び豚肉（及びその内臓）の生食用提供の禁止という行政措置が実施された。一方で、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、国内での牛の肝臓各部位等における志賀毒素遺伝子の分布調査、牛肉中の寄生虫汚染実態に関する調査を行った。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、消毒薬、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) 牛肉中の食中毒危害性住肉胞子虫汚染調査

(1)- 1. 牛肉における住肉胞子虫検査

平成 25 年 11 月に病畜として搬入されたメスのホルスタイン種 (44 ~ 101 か月齢) のウシ 6 頭からそれぞれ筋肉 8 ~ 9 ヶ所計 52 ヶ所を採材した。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。住肉胞子虫検出は、1 検体あたり 2×2×2 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のち、筋肉の走行に垂直に切り出し、常法に従って HE 染色を施し、切片 1×1 cm 中の住肉胞子虫シストを計数した。また、厚生労働省が

通知した馬肉中の住肉孢子虫遺伝子検査法を参照し、採材した肉検体から 0.3 g を取り出し、ミンチ状とした懸濁液の上清から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出精製して、住肉孢子虫 18S rRNA 遺伝子を標的とする 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、試薬は 10×Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa) を用いた。PCR 産物は研究室保有の *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子増幅断片を陽性コントロールとして、2% アガロースゲルで電気泳動を行った。約 1,100 bp の遺伝子増幅産物が確認されたものを陽性とした。

(1) - 2 住肉孢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。

上記の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。

(2) 肝臓内部、表面、胆汁と肛門組織からの *stx* 遺伝子の検出

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検体を採取し、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、50 g の肝臓を、4 月から 9 月までは 100 g の肝臓を取り出し、それぞれ等量の PBS を加え、ストマック処理を行なった後、1 mL を 1.25 x TSB、4 mL に加え 37°C で一晩増菌培養した。2015 年 10 月から 12 月までの検体は、50 g の肝臓に 50 mL の TSB を加えストマック処理を行った。その後、TSB で総量 250 mL となるようにメスアップし、37°C で一晩増菌培養した。それぞれの増菌培養液 1 mL を回収し、遠心分離後上清を捨てペレットに 1 mL の TE を加え、100°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。

(3) 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

(3) - 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、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 50 g (2015 年 1 月より 3 月まで) あるいは約 100 g (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 μ 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 25 g の肝臓を採取し、 -30°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°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°C で一晩培養後、腸内細菌科菌群の有無を判定した。

(3) - 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 5 g、合計 50 g を採取して上記と同様に処置した。さらに、10 カ所から 2.5 g ずつ採取し合計 25 g を -30°C で凍結融解後、上記と同様に処置した。

(4) 放射線照射による微生物除去

(4) - 1 . 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は 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°C で冷凍保存した。

2-ACBs 定量用の牛肝臓試料は、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)にいれ、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°C)照射では氷中に 3 時間、凍結(-80°C)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。

(4) - 2 . 供試菌株

Salmonella Enteritidis IFO3313 株は Trypticase Soy Broth (TSB; Difco) にて 35 一昼夜静置培養した後、リン酸緩衝溶液に再懸濁し、 10^9 CFU/mL となるように調整して試験に用いた。

(4) - 3 . ガンマ線照射

ガンマ線照射には、コバルト 60 線源を装填した Gamma Cell 220 (Nordion, Canada) を用いた。照射時の温度は、氷冷(0°C) および冷凍(ドライアイス下) (-80°C) の 2 条件を設定した。線量率は約 2.97 kGy/h であった。

正確な吸収線量は模擬試料に装着したアラニンペレット (ES200-2106: ブルッカーバイオスピン社製) の信号を ESR 装置 (Bruker EMX-Plus) 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。

(4) - 4 . 牛肝臓のガンマ線殺菌効果確認試験

25g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、終濃度で 10^8 CFU/g 程度 (生残曲線作成用) あるいは 10^5 CFU/g 程度 (殺菌効果確認用) となるように調製した供試菌液 100 μ L を注入することで行った。菌体接種後の試料は、直ちにガスバリア袋

を用いて含気あるいは真空包装を行った。包装後の検体は、-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、ガンマ線照射に供した。

生残曲線を作成するための試料は、目標線量として、冷凍下で 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 kGy の線量を照射した。また、殺菌効果確認用の試料は、冷凍条件下で、目標線量、6、7、8 kGy の3段階の線量を照射した。

照射後の検体は、解凍後直ちに菌数計測した。

(4) - 5 . 生菌数測定および標的微生物の検出

ガンマ線照射後の検体に滅菌緩衝ペプトン水 (BPW: Difco)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 (Merck)およびVRBG平板 (Oxoid)にスパイラルプレーティング法で塗抹した。これらの平板は35 で各々24時間培養し、その出現集落数から1g当たりの一般生菌数ならびに *Salmonella* 数を求めた。さらにVRBG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、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

殺菌線量を求める実験では、目標線量 (6、7、8 kGy)を照射した後、検体に滅菌緩衝ペプトン水を加えて10倍乳剤とした後、35 で一昼夜培養した。培養した菌液は標準寒天平板およびVRBG平板 (Oxoid)に一白金耳を画線し、35 で一昼夜培養した。出現した集落は、それぞれ釣菌し、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

(4) - 6 . 2-アルキルシクロブタノン分析

照射および非照射の牛肝臓 (約 50g) から、約 3g の肝臓を秤量し、メタノール 50mL 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 50 mL のクロロホルム/メタノール (2:1) (C/M) 溶液で2回抽出し、最後に 20mL の C/M 溶液で洗浄した。集めた抽出液に 0.88% KCl 溶液 93 mL を加えて分液口途中で混和し、4 の冷蔵庫中で1晩放置後、クロロホルム層を集めた。この抽出物の溶媒を留去後、アセトニトリル 2mL に再溶解させた。これを2回繰り返して、アセトニトリル溶液を合わせ、-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、2mL のヘキサンに再溶解した。この溶液を 1mL ずつ、ガラス製の 1g のシリカゲルカラム (Merck Silica gel 60 70-230 mesh) 2本に添加し、10 mL のヘキサンで洗浄後、ヘキサン/ジエチルエーテル (98:2) 15 mL で溶出し、その 5-15mL 画分を集めた²⁾。この試料を濃縮して、内部標準物質として、2-cyclohexylcyclohexanone、0.05 µg / mL を含むヘキサン 200 µL に溶解した。この試料を 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。なお、検量線は、2-ACBs の標準試料に、非照射の牛肝臓か

らの抽出精製物を添加したマトリックススタンダードを用いて作成した。

< GC-MS 条件 >

GC 装置: GC : GC-2101,
検出器 : MS : QP2010+ Shimadzu
200
カラム : DB-5MS(60m×0.25mm
0.25 μ m) カラム温度 : 55 (2min)→20
/min→175 , 2 /min→250 , 10
/min→270 (20min)
注入口 250
注入モード : パルスドスプリットレス
注入サンプル量 1 L
モード : EI (70eV) SIM 測定
定量イオン : m/z = 98
確認イオン : m/z = 112

(4) - 7 . 電子線照射に関する予備試験

(株)原子燃料工業 NFI 照射サービスに委託し、同社が保有する電子加速装置 Rhodotron (10 MeV 200 kW, IBA 社製)を用いて実施した。

10 MeV 電子の深部線量分布 (depth-dose)を確認するため、比重約 1 g/cm³、厚さ約 20 mm の板状こんにゃくを模擬試料とし、4 枚重ねにしたこんにゃくに斜めに切り込みを入れ、テープ状の CTA フィルム線量計 (FTR-125 富士フィルム社製)をはさみ、10 MeV、12 mA の電子を照射した。片面照射時の試料厚さは 86.4mm コンベア速度は、5.71 m/min、両面照射時の試料厚さは 81.5 mm コンベア速度は、7.61 m/min であった。CTA フィルムの 280 nm における吸

光度から、試料表面からの深さ方向における吸収線量 (kGy) を算定した。

殺菌効果の予備試験としては、25g の肝臓試料に 10⁵ CFU/g となるように *Salmonella* を接種し、ガスバリア袋で包装して凍結 (-80)した試料を、発泡スチロール製の箱に入れたドライアイスの上に重ならないように並べ、両面から 10 MeV、4 mA の電子で両面照射した。コンベア速度は、目標線量 6、7、8 kGy に対し、それぞれ、13.68、11.73、10.26 kGy/m とした。肝臓試料の照射方向に対する厚みは、10~15 mm 程度であった。照射条件ごとに、ラジオクロミックフィルム線量計 (FWT-60) を試料表面に装着した常温の肝臓試料を同時に照射し、吸収線量の確を行った。

(5) 高圧処理による鶏ササミ中の食中毒原因菌の不活化

供試菌株には、*Salmonella* Typhimurium LT2 株と *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 株を用いた。

高圧処理を行う食品検体は、市販の鶏ささみ肉を用いた。接種試験用の検体は 10g 片に切断し、菌液を接種して高圧処理用袋に二重に密封した。硬度及び色彩を測定する検体と病理組織学的検索に用いる検体は、細切せずに 1 本のまま処理した。高圧処理は TSF6-50 (東洋高圧)を用いて 300MPa、5 分を 6 回反復する条件で行った。

カンピロバクターに対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を 4 倍量の MH 液体培地中で 5 倍乳剤を作成し、各 100 μ l を MH 寒天平板及び CCDA 寒天平板に

塗布後、MH 培地は 37℃、CCDA 培地は 42℃ にてアネロパック及び嫌気ジャーを用いた微好気培養を行い、48 時間後に定型集落の計数を行った(定量試験)。また、一部検体を Bolton 培地で処理し、37℃ で 4 時間、41.5℃ で 44 時間微好気培養後に CCDA 培地に塗布し、42℃ 48 時間培養後に定型集落の確認を行った(定性試験)。サルモネラ属菌では、高圧処理後の検体を 4 倍量の滅菌生理食塩水中でストマツカー処理して 5 倍乳剤を作成し、各 100 μ l を BHI 寒天平板及び CHROMagarSalmonella 平板に塗布後、37℃ で好気培養を行い、48 時間後に定型集落の計数を行った(定量試験)。また、5 倍乳剤の残りは 37℃ で 18 時間前増菌培養後、RV 培地に接種して 42℃ 22 時間増菌培養ののち、CHROMagarSalmonella 平板に塗布する定性試験を実施した。定量試験では、平板に発育した定型集落数と希釈倍率から、高圧処理前及び処理後の検体中の菌数を算出した。

高圧処理による鶏ササミ肉の硬度及び色調の変化は、菌を接種しないササミ検体に上記の高圧処理を行って計測した。未処理、300MPa、5 分の高圧処理を 1 回、3 回及び 6 回かけた検体について、レオメーター TP - 10 (ヤマデン) を用いて硬度を、色差系 (コニカミノルタ) を用いて色調を計測した。

(6) 高圧処理による微細形態変化の観察

平成 25 年度の報告書にある「高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不

活化に関する検討」、ならびに「高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関する検討」と同様に行った。高圧処理後の検体については 1mm 角ほどに細切し、固定後、定法に従って電子顕微鏡による観察を行った。

C. 結果及び考察

(1) 牛肉中の住肉胞子虫

咬筋の薄切 HE 染色標本中に、*S. cruzi* と推定されるブラディゾイトを包有した住肉胞子虫のシストが観察された。

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では、住肉胞子虫のシスト内のブラディゾイドが褐色に染色された。この染色状態は、これまで報告されている馬肉や牛肉(心筋)と同一であったことから、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、牛の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た。しかし、*S. cruzi* を原因とする食中毒事例はわが国では報告がなく、その病原性は不明である。今後、牛肉の住肉胞子虫の危害を分析するにはそれらの情報が必要である。

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ところ、全頭でいずれかの部位にシストが確認された。最も効率に検出された部位は心筋で(100%)、次に横隔膜筋および咬筋(83.3%)だった。9 ヲ所すべての部位からシストが検出されたのは、6 頭中 2 頭だ

った。シストの数は個体によって変動がみられたが、心筋では 1 cm² 当たりの平均シスト数が 0.1 から 3.5 であった。心筋が最もシスト数の多い部位であり、ヒレ、ネック、舌と続いた。今回の研究で、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。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抽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、顕微鏡検査を正当に行えない危険性がある。そのため、本研究では古典的であるが、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、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。

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、牛肉中の住肉胞子虫遺伝子検査を実施した。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。30 サイクルの PCR で、*S. fayeri* 由来 DNA では、約 1,100 bp のバンドを検出した。ウシのネック部、横隔膜、舌からの DNA についても、約 1,100 bp の PCR 産物が確認された。以上より、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、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、牛肉から抽出した DNA への応用が可能であることが確認された。また、結果には示していないが、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。

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を検討した。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。以上より、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果は大きくかい離していた。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 μm 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、住肉孢子虫の 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、牛肉における住肉孢子虫の危害性を評価するには、現行の住肉孢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孢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 16S 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。

(2) 肝臓内部、表面、胆汁と肛門組織からの *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 検体の肝臓内部及び 80 検体の胆汁からは *stx* 遺伝子は検出されなかった。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 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、

48 検体の肝臓左葉と右葉、及び 36 検体の胆汁から *stx* 遺伝子は検出されなかった。肝臓表面からは 48 検体中 6 検体で *stx2* 遺伝子が、肛門組織からは 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。

STEC 汚染は畜産食品の生食において最も問題となるものであるが、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。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。

(3) 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 月までの検討で、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、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。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、2.5gを10カ所から採取し、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(2,000ppmと500ppm)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500ppm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。2,000ppmを用いた場合もほぼ同様の結果であった。一方、消毒薬E(400ppm)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。

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。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、消毒薬A(2,000ppm)を用いた場合、25g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(2,000ppm)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、2.5gを10カ所から回収し同様の実験を行った。その結果、消毒薬A(2,000ppm、500ppm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。

(4) 放射線照射による微生物除去

(4) - 1 . 凍結した牛肝臓中での *Salmonella* の殺菌効果 凍結した牛肝臓中での *Salmonella* の殺菌効果について、25 年度の実験では、*Salmonella* について凍結 (-80) 含気条件で 1.33、脱気条件で 1.21 kGy と得られていたが、既存論文との整合性が取れなかったため、追試を実施した。その結果、含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy という数値が得られ、結果の整合性を確認した。すなわち、本条件下で *Salmonella* 菌数を $1/10^5$ とするには含気条件で 7.2、脱気条件で 7.9 kGy が必要と推察された。ただし、これは指数関数型として殺菌されたと仮定した場合の線量であり、シグモイド型による殺菌効果として考えた場合には上記殺菌線量は過大となる可能性も考えられた。このため、規定線量による *Salmonella* の殺菌効果確認試験を試みた。上記の検討結果から、おおよそ 6~8 kGy の照射により、*Salmonella* の菌数を $1/10^5$ に減少させることが死滅曲線から予想されたため、約 10^5 CFU/g となるよう *Salmonella* を接種した検体 (n=5) を作成し、牛肝臓中の線量が 6、7、8 kGy となるような照射した場合の不活性化 (5 log cfu/g 低減の可能性) について検討を行った。その結果、凍結含気包装下においては 7 kGy で、凍結脱気包装下においては 8 kGy で、5 検体中全てから *Salmonella* は非検出となった。本試験にて接種した菌数は 3.0×10^5

CFU/g と求められており、これまで作成した死滅曲線から得られた D_{10} 値と併せても、妥当な結果と推察された。

(4) - 2 . 腸内細菌科菌群の放射線抵抗性に関する文献調査

生食用牛肉の規格基準においては、衛生基準として腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) を指標菌としているため、殺菌効果の検証に腸内細菌科用いる可能性を想定し、本研究での検討菌で最も放射線抵抗性が強かった *Salmonella* よりも抵抗性が強い腸内細菌科の細菌が存在する可能性について、文献調査を行った。Farkas の総説によれば、腸内細菌科細菌の放射線抵抗性は、*Yersinia enterocolitica* < *Shigella spp.* < *Escherichia coli* (O157:H7 を含む) < *Salmonella spp.* の順に大きくなると報告されている。また、2014 年に公表された、オーストラリア農務省の調査報告書に整理された細菌の放射線感受性のデータを参照に、腸内細菌科の D_{10} 値を整理すると、*Salmonella* と並んで *Enterobacter sp.* の放射線耐性が高かった。*Enterobacter* 属菌について、Osaili らは、ブレインハートインフュージョン培地中、加水ミルクパウダー中および、乾燥ミルクパウダー中での *E. sakazakii* ATCC 51329 他 5 株の D_{10} 値はそれぞれ、0.21- 0.29 kGy、0.24 - 0.37 kGy、1.06-1.71 kGy の範囲であったと報告している。また、Lee らは、TSB 中及び乾燥ミルクパウダー中での *E. sakazakii* strain ATCC 29544 の D_{10} 値を、それぞれ 0.27 及び 0.76 kGy と報告している。*E. sakazakii* についての放射線抵抗性に

関する情報を考慮すると、牛肝臓中での *Enterobacter* 属菌の汚染可能性や放射線感受性について、今後さらに検討を要すると考えられる。

(4) - 3 . 牛肝臓のガンマ線照射による 2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)の生成

前年度の研究における 2-ACBs の定量結果では、線量依存的な 2-ACBs の生成を確認したものの、用いた分析法の添加回収率が 59%~68%と低かった。原因として、肝臓中の酵素による 2-ACBs の代謝反応が抽出中に進行する可能性が考えられた。そこで、肝臓を無水硫酸ナトリウムと混和後に高速ホモジナイザーを用いてヘキサンで抽出する方法から、硫酸ナトリウムによる脱水操作を止めてタンパク質が変性しやすいクロロホルム/メタノール溶媒を使って一気に抽出する方法に変更した。その結果、本年度用いた方法での添加回収率は、低濃度添加、2-dDCB および 2-tDCB を 3.3 ng/g FW、2-テトラデセニルシクロブタノン (2-tDeCB) を 8.1 ng/g FW で、 96.2 ± 5.7 , 88.3 ± 2.5 および $116.2 \pm 6.0\%$ (n=7)であった。また、高濃度添加として 2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB を 33 ng/g FW、33 ng/g FW、81 ng/g FW で添加した際の回収率は 79.3 ± 1.6 , 73.5 ± 3.1 および $77.4 \pm 2.1\%$ (n=7) であった。抽出方法を変更することで、回収率が向上し、回収率の標準偏差も小さくなった。

異なる温度包装条件で照射した際の 3 種の 2-ACBs の定量解析では、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

条件での分析値を線量に対して直線回帰した傾きから、1 kGy あたりに換算した 2-ACBs の生成量を求めた。この際の相関係数は、0.88~0.99 であった。

肝臓生重量 1g・1 kGy 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。また、-80 照射においては、含気包装時の 2-tDeCB の生成量は脱気包装より有意に大きかった。分析方法の変更により、昨年の報告値より、総じてやや高い値が得られたが、これまでの文献値にある他の畜肉での生成量に比べて著しく多量の 2-ACBs が照射牛肝臓中に生成することは無いと判断された。

(4) - 4 . 電子線照射に関する予備試験

(4) - 4 - 1 . 透過力の確認

電子線は線量率がガンマ線に比べて著しく大きい、その透過力はガンマ線に比べて劣っている。そこで牛肝臓に対する電子線の照射効果を検討する予備試験として、10 MeV 電子照射時の深部線量分布を確認した。

厚さ 86.4 mm(比重約 1g/cm³)の模擬試料に線量計を設置し、上面方向から 10 MeV 電子を照射した際の、線量分布の結果から、片面照射における電子の有効な透過厚さを、試料表面とほぼ同等の線量となる厚さと考え、試料厚さで約 36 mmが片面照射の上限厚さと考えられた。

片面照射時と同様に 4 枚重ねの模擬試料を両面照射した際の深度-線量分布では、照射した模擬試料の厚さは、81.5 mmであった。実測した線量分布から、最大/最小線量比(Dose Uniformity Ratio)は約 1.5 程度であった。また、中央部の線量が表面線量と同等の線量となる厚さを両面照射で透過可能な厚さであるとして、片面照射の深度線量分布のデータから両面照射において透過可能な厚さを推定すると、約 85 mmであった。

(4) - 4 - 2 . 殺菌効果の予備試験

前項の結果を参考に、重量 25g、厚み 10~15 mm 程度の牛肝臓の中心に 3.1×10^5 CFU/g の *S. Enteritidis* IFO3313 株を接種して、含気、凍結状態(-80)で 10 MeV 電子を両面から照射した(n=5)。目標線量 6、7、8 kGy に対して、ラジオクロミック線量計で測定した同形のダミー試料の吸収線量は、6.3、7.2、8.2 kGy (両面の平均)であった。含気条件、凍結状態(-80)において 8kGy で、5 検体中全てから *Salmonella* は増菌培養を行っても非検出となった。7 kGy では、5 検体中 3 検体が陽性であった。この結果は、上述したガンマ線における殺菌効果とは一致せず、電子線の効果の方がガンマ線に比べて、やや劣る可能性を示唆している。ガンマ線と電子線の殺菌効果については、同等とするもの、電子線の効率が低いとするもの、ガンマ線の効率が低いとするものなど、異なる傾向が報告されている。ただし、これらの差異は極端なものではなく、また、殺菌効率の異なる理由も線量率の違いや、照射時の環境の影響の可能性も考察されておりガンマ線、

電子線の作用が本質的に異なるとは解釈されていない。牛肝臓の電子線照射については、今後、標的菌株の生残曲線を作成しての D_{10} 値の算出など、さらに詳細に検討する必要がある。

(5) 高圧処理による検討

(5) - 1 . 鶏ササミ中に接種したサルモネラとカンピロバクターへの菌数低減効果

300MPa、5 分 6 回反復の高圧処理を 3 回実施し、処理前後の鶏ササミ中の菌数の平均及び標準偏差を求めた。

高圧処理前の鶏ササミにおけるサルモネラ及びカンピロバクターの菌数は、約 1.04×10^8 CFU/g 及び約 7.2×10^7 CFU/g であった。高圧処理後のサルモネラ菌数は、非選択培地である BHI 培地上に形成された集落数で、1 回目が 8.5×10^2 CFU/g、2 回目が 1.05×10^6 CFU/g、3 回目が 9×10^2 CFU/g であった。3 回の試験のいずれにおいても、BHI 培地上の集落数は、選択分離培地である CHROMagarSalmonella 上よりも多く、高圧処理により損傷菌が発生している事が示された。高圧処理後のカンピロバクター菌数は 3 回とも菌が検出されず、検出限界以下となった。但し、いずれにおいても増菌培地を用いた定性試験においては、高圧処理後の検体からカンピロバクターが検出された。

(5) - 2 . 高圧処理が鶏ササミの色調と硬さに及ぼす影響

300MPa、5 分の高圧処理による鶏ササミの肉色及び硬さの変化を測定した。鶏ササミの肉色は、明るさを示す L 値が

300MPa の高圧処理の反復を行うことで大きくなり、色調の明るさが増す結果となった。一方、赤みを示す a 値は高圧処理により、未処理のものよりも小さい値となり、高圧処理により赤みが失われることが示された。黄色みを示す b 値は高圧処理により数値が上昇していた。いずれの値も、処理回数に比例しての増加ではないものの、1 回の処理で色調の変化を起こすことが示され、肉眼的な観察と相関する数値となった。硬さについては、最大破断点の加重により評価したところ、高圧処理の反復により加重値が上昇し、硬さが増すことが示された。

今回、過去の論文において有効とされた 5 分間の高圧処理を 6 回反復させる条件での検討を実施し、カンピロバクターに対しては 7 log 削減という高い菌数低減効果が可能となった。また、試験間の結果のばらつきも見られず、安定した効果が得られた。増菌培養により菌が検出されたため、完全な菌の除去には至らなかったものの、今回の条件が鶏肉中のカンピロバクター低減に効果的であることが示された。一方、サルモネラに対しては、平均して 3log の削減にとどまり、試験間のばらつきも大きかった。また、サルモネラについては損傷菌の発生が見られたことから、処理後の保存条件によっては生残菌数が増加する可能性があると思われた。これらの結果から、サルモネラがカンピロバクターよりも高圧処理に対する抵抗性が高いこと、今回の高圧条件はサルモネラに対しては効果が限定的であることが明らかとなった。一方、肉質の変化については、高圧処理により肉

色に変化しており、硬さも増加して、6 回の処理を行ったものについては、加熱処理したものと類似した肉色となっていた。以上の結果から、鶏ササミにおいて十分な殺菌効果を確保しつつ肉質変化を最低限に抑えた実用的な高圧処理条件を見いだすには、圧力条件と処理回数の組み合わせを変えた検討、高圧処理後の保管温度による生残性等の検討を追加する必要があり、生食用としての提供には、更なる検討が必要であるが、最終的な包装形態で殺菌処理を行うため、処理以後の工程で微生物汚染を受けることなく流通が可能な高圧殺菌は、畜産食品における衛生保持や品質保持期限の延長に有用であると思われる。

(6) 高圧処理を行った牛肝臓の微細形態の観察

高圧処理済みの牛肝臓について、電子顕微鏡を用いた微細形態の観察を行ったところ、細胞質のミトコンドリア内部に球状の無構造な凝集物が蓄積しており、その大きさは圧力の増加に伴い、増大していく様子が見られた。また、核の周囲に存在する粗面小胞体については、処理圧が高くなるほど不明瞭となっていた。

高圧処理後の牛肝臓の電子顕微鏡観察において認められたミトコンドリア内部の凝集物はミトコンドリア基質タンパクの変性によるものと考えられた。また、このようなミトコンドリアの変化は、光学顕微鏡観察において認められた細胞質内の好酸性小顆粒に対応しているものと考えられた。

D. 結論

本研究により、牛肝臓における住肉胞子虫の汚染実態の一部が明らかとなった。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、牛の住肉胞子虫にも存在すること、その形態から *S. cruzi* と思われることが示された。厚生労働省が通知した馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査の方法が、牛検体においても応用可能であったが、顕微鏡による検査法の結果とのかい離もみられ、試験法の改善が必要と思われた。*S. cruzi* を原因とする食中毒事例の国内報告はなく、その病原性は不明である。今後、牛肉の住肉胞子虫の危害を分析するにはそれらの情報が必要である。

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。

牛肝臓内部に接種した *Salmonella* Enteritidis IF03313 株のガンマ線殺菌を行い、 D_{10} 値として、凍結 (-80) 含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58kGy を得た。また、*Salmonella* を 10^5 CFU/g 接種した検体について、目標線量、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

($n=5$)。副生成物については、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) 6 kGy, 凍結(-80)10kGy 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。分析方法の変更により、昨年の報告値より総じてやや高い値が得られたが、これまでの文献値にある他の畜肉での生成量に比べて著しく多量の 2-ACBs が照射牛肝臓中に生成することは無いと判断された。

鶏ササミに人工的に添加した食中毒原因菌の高圧処理による不活化を検討したところ、300MPa で 5 分を 6 回反復する処理により、カンピロバクターは 7 log、サルモネラは 2-5log の菌数低減が可能であった。一方、鶏ササミの肉質については、高圧処理により色調や硬さに変化が見られたため、生食用としての提供を可能にするには更なる条件検討が必要と思われた。

高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関して検討を行った結果、光学顕微鏡による観察において認められた細胞質内の好酸性小顆粒がミトコンドリアの変性によって生じた変化であることを明らかにした。高圧処理を行った牛肝臓の硬さの変化は、肝細胞の索状配列や小葉構造などの肝臓の組織構造の変化によるものではなく、細胞内の微細構造の変化に起因するものであると考えられた。

E. 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た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。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

講演・研修会等

川崎晋, 持田麻里, 等々力節子, 五十君静信. ガンマ線照射による牛肝臓・挽肉中での腸管出血性大腸菌の殺菌効果、第 19 回 腸管出血性大腸菌研究会(東京), H27/7/9-10.

G. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし