

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ることで殺菌可能な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つの部位に分けて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）で高いことがわかつ

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 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。

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 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。

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、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。

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て評価したところ(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。

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 [§] (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 [#] (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 ⁺	凍結有 ⁺	凍結 2 次増菌 ^{&}	凍結無 ⁺	凍結有 ⁺	凍結 2 次増菌 ^{&}
A* [30#]	13 [§] (43)	11 (37)	18 (60)	12 (40)	8 (27)	18 (60)
B** [16]	12 (75)	9 (56)	15 (94)	11 (69)	9/15 [#] (60)	15/15 [#] (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、+大腸菌群細菌、&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 ^s (44)	6 (33)	16 (89)	18 (100)	6/14# (43)
A 2,000 ppm* [22]	10 (45)	5 (23)	19 (86)	21 (95)	2/15# (13)
E 400 ppm ^{ss} [12]	1 (8)	1 (8)	6 (50)	4 (33)	1/10 (10)

#総検体数、^s陽性検体数、⁺大腸菌群細菌、&腸内細菌科菌群、*H27/10-H27/12、^{ss}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 ^s (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、^s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 ^s (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、^s陽性検体数

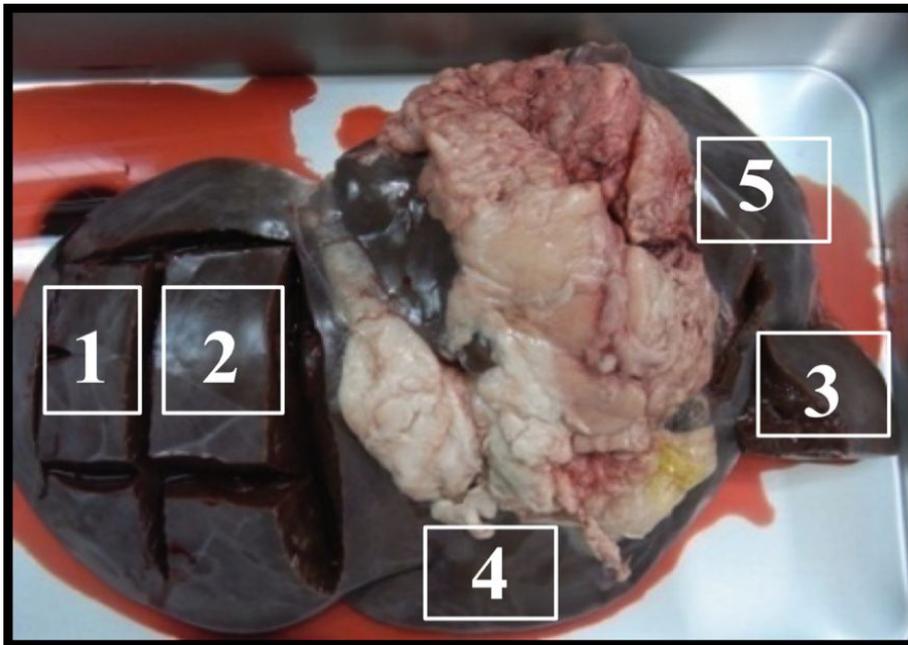


図. 肝臓から採取した部位 1-5 を示す、左葉 (部位 1 と 2)、右葉 (部位 3-5)