

201522011B

厚生労働科学研究費補助金

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

平成25 - 27年度 総合研究報告書

(課題番号：H25 - 食品 - 一般 - 011)

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

平成28 (2016) 年3月



## 目次

### I. 平成 25-27 年度総合研究報告書

- 畜産食品の安全性確保に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・1  
研究代表者 岡田 由美子

### II. 総合分担研究報告書

1. 諸外国における食肉の生食実態及び衛生管理実態に関する調査・・・・・・・・35  
岡田 由美子、五十君静信
2. 畜産食品における寄生虫性危害に関する研究・・・・・・・・・・・・39  
鎌田 洋一、白藤 由紀子、佐藤 弘隆、三井 太平
3. 牛肝臓内の大腸菌の分布とその殺菌法の検討・・・・・・・・・・・・55  
山崎 伸二、日根野谷 淳
4. 放射線照射による微生物除去・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・71  
等々力 節子、川崎 晋、都築 和香子
5. 高圧処理による畜産食品中の食中毒原因菌の不活化に関する研究・・・・・・・・83  
荻原 博和、岡田 由美子、鈴木 穂高、吉田 麻利江、阿部 申、道下 正貴、  
畠山 仁

平成 25-27 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

畜産食品の生食による健康被害の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、3年間の研究を実施した。危害分析として、日本国内での牛の消化管各部位における大腸菌群及び病原性大腸菌の汚染実態、国内の寄生虫性食中毒の実態把握、シカ肉及び牛肉における住肉孢子虫の寄生実態、諸外国における畜産食品の生食実態及びその管理手法についての情報収集を実施した。低減手法としては、非加熱殺菌法である放射線照射、消毒薬による殺菌及び高圧殺菌を用いた検討を行った。

食肉処理場で処理された牛の肝臓のうち、採取した部位により大腸菌群の陽性率に差が見られた。また、汚染菌数及び汚染率には季節変動が見られ、夏場に高く冬場に低い傾向が見られた（夏場：32-81%、冬場：13-50%）。かつて生食用として利用されていた部位の汚染状況は比較的低く、その汚染菌数は最大で  $10^6$ CFU/g 程度であった。胆汁中の大腸菌群菌数が高かった個体では、肝臓中の大腸菌群菌数も高い傾向が見られたが、肝臓中の汚染が見られる検体で胆汁中の汚染が陰性の例も見られた。腸管出血性大腸菌の指標とした *stx* 遺伝子の検出では、肝臓表面と生食用としては提供されていなかった肝臓部位の内部からは陽性検体が見られたが、生食用として提供されていた肝臓部位の内部からは検出されなかった。

流通している野生のエゾシカにおいては 50 検体中 48 検体（96%）が住肉孢子虫陽性であり、高率に汚染されていることが明らかとなった。病畜として搬入された牛 6 頭について住肉孢子虫を検査したところ、心筋から 100%の汚染率で検出され、その他の部位においても住肉孢子虫が検出された。

諸外国における生食実態の情報収集では、様々な国において畜産食品の生食がなされていることが明らかとなり、中でもドイツにおいて豚の生挽肉製品（メット）が容器に包装され、スーパーマーケット等で流通していることが分かった。しかしながら、メットに対する特別な規格基準等は存在しておらず、食中毒リスクが高いと判断される食品については行政当局による監視指導の頻度を上げる手法により管理している他、製造者による自主規制を行っていることが示された。一方で、諸外国では、生肉を原因食品とするサルモネラ、腸管出血性大腸菌、エルシニア、旋毛虫等による食中毒が発生していることも明らかとなった。

放射線照射による牛レバー中の食中毒菌低減手法については、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラを用いてガンマ線による検討を行った。その中で最も放射線抵抗性が高かったサルモネラ菌株の生残曲線から求めた  $D_{10}$  値は、 $0^{\circ}\text{C}$  含気条件で  $0.62\text{ kGy}$ 、脱気条件で  $0.63\text{ kGy}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}$  含気条件で  $1.43\text{ kGy}$ 、脱気条件で  $1.58\text{ kGy}$  であった。また、同株を  $10^5\text{ CFU/g}$  を接種した牛肝臓各 5 検体について、6、7 及び  $8\text{ kGy}$  のガンマ線照射を行ったところ、含気条件で  $7\text{ kGy}$ 、脱気条件で  $8\text{ kGy}$  によって全検体がサルモネラ非検出となった。照射による副生成物については、脂質の放射線分解物が  $0^{\circ}\text{C}$   $6\text{ kGy}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}$   $10\text{ kGy}$  までの照射で線量依存的に生成することが確認されたものの、 $1\text{ kGy}$  の照射により前駆脂肪酸  $1\text{ nmole}$  から生成する 2-アルキルシクロブタノン類はこれまで照射された畜肉中で報告されている値より小さいものであった。また、トランス脂肪酸も線量依存的な微増が見られたが、WHO の推奨値との比較において、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えるものではないと考えられた。脂質酸化の指標であるチオバルビツール値は  $0^{\circ}\text{C}$  含気条件での増加が見られたが、脱気条件下及び  $-80^{\circ}\text{C}$  ではほとんど変化がなかった。フランについては照射後も検出されなかった。照射により牛肝臓臭気の変化が確認され、その原因となる可能性のある物質として、ベンジルメルカプタン、フェニルエチルアルコール、スカトールが検出された。

消毒薬による殺菌法は、胆管から消毒薬を注入したのち、肝臓各部位における大腸菌群の検出を行う方法で評価した。その結果、塩素系消毒薬では大腸菌群陰性となる割合が高いものが見られた。非塩素系消毒薬では、殺菌効果はほとんど認められなかった。また、急速冷凍とチルド融解を組み合わせる手法についても検討した。その結果、凍結融解を行ったもので大腸菌群陽性率が低くなる結果が認められたものの、その後の増菌培養で腸内細菌科菌群が高率に検出された。

高圧処理による殺菌では、 $500\text{ MPa}$   $10$  分の処理で大腸菌 ATCC25922 株を  $5\text{ log}$  減少させることが可能であった。一方で、圧力条件に比例して、肝臓の白化、硬化が見られたため、 $250\text{ MPa}$ 、 $60-180$  分の処理を行ったところ、肝臓の変色、硬化は少なかったものの、菌数低減は  $2\text{ log}$ にとどまった。また、近年高圧殺菌を行うための機器の開発も進んでいることから、牛肝臓以外に鶏ササミを用いて  $300\text{ MPa}$   $5$  分を 6 回反復させる実験を行ったところ、カンピロバクターについては定性試験で菌が検出され、完全な殺菌には至らなかったものの、定量試験では  $7\text{ log}$  以上の菌数低減が可能であった。サルモネラについては結果のばらつきが見られ、 $3-5\text{ log}$  の菌数低減であった。一方で、ササミの変色、硬化が認められた。

以上の結果から、畜産食品の生食には、牛肝臓の腸管出血性大腸菌症、シカ肉及び牛肉の住肉胞子虫、豚肉のサルモネラ症及びエルシニア症等の健康被害リスクがあることが示された。本研究で検討した非加熱殺菌法において、実験開始当初には汚染菌を  $5\text{ log}$  削減させることを目標と設定していたが、国内の 1 か所の食肉処理場からの肝臓検体で、 $10^6\text{ CFU/g}$  以上の大腸菌群汚染が見られた。また、大腸菌群汚染率、汚染菌数共に夏場

に高く、冬場に低い傾向を示すことが明らかとなった。今回検討した非加熱殺菌法のうち、現時点で牛肝臓内の食中毒原因菌に対して一定の低減効果が得られたものは、放射線照射及び高圧処理であった。但し、放射線照射は、牛肝臓に臭気が発生するという問題点もあった。また、高圧処理については、臭気の変化はなかったものの、色調及び硬度の変化が見られる問題点が残された。いずれの殺菌方法でも、これまでに検討した条件では、本研究で明らかになった中で最も高いレベルの大腸菌群の汚染があった検体 ( $10^6$  CFU/g 以上) について、完全に汚染菌を死滅させるには十分ではない可能性が示唆された。

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

都築 和香子 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

白藤 由紀子 岩手大学

佐藤 弘隆 岩手大学

三木 太平 岩手県食肉衛生検査所

阿部 申 日本大学

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、牛肝臓及び豚肉と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。しかし、流通は限定的であるものの、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、鶏肉の生食によるカンピロバクター等による食中毒事例も数多く報告されている。一方、一部の国民からは、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微生物を低減し、可能であれば安全に提供することを目的として、消毒薬、放射線

照射及び高圧処理の効果と問題点について科学的に検証した。

## B. 研究方法

### (1) 諸外国における食肉の生食実態調査

平成 25 年度は、海外においてどのような種類の食肉が生食されているか、また、それらによる健康被害の発生状況について、株式会社三菱総合研究所への委託調査を実施した。調査は、インターネットを通じて生食料理実態及びそれらによる健康被害実態について行うと共に、PubMed 等による文献調査、更に各国大使館への電話及び書面送付を通じて実施した。平成 26 年度には、同研究所への委託調査として、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) 牛消化管、肝臓、唾液及び胆汁中の大腸菌群の菌数

牛肝臓から無菌的に約 50 g の組織を切り出しストマック袋に入れ、等量の滅菌 PBS を加えストマック処理を行った。その他消化管組織と内容物は、それぞれ 10 g を取りだし、組織は等量の滅菌 PBS を加えストマック処理を、内容物は 90 ml の滅菌 PBS に懸濁した。唾液は 5 mL、胆汁は 10 mL 採取した。それぞれ処理後の液、唾液と胆汁を滅菌 PBS で 10 倍段階希釈し、SMAC 寒天培地に植菌し

STEC の有無及び大腸菌群の菌数を調べた。

### (3) 牛肝臓から分離した細菌の菌種同定

牛肝臓内から分離した細菌からボイル法で鋳型 DNA を調製し、16S rRNA 遺伝子、約 500 bp を増幅できるプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を精製後、塩基配列を解析し菌種を同定した。

### (4) 組織化学的解析による牛肝臓内の細菌汚染部位の同定

牛肝臓約 10 g を切り出し、直ちに中性の 10% のホルマリン溶液に浸漬した。プロセッサを用いて組織を固定化し、パラフィンで包埋後、マイクロームカッターで厚さ約 3  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色後、顕微鏡にて細菌汚染を確認した。

### (5) 牛消化管、肝臓内、胆汁における *stx* 遺伝子の検出

屠畜解体直後に採取した舌、第一胃内容物、十二指腸、十二指腸内容物、盲腸、盲腸内容物、肛門、肛門内容物をそれぞれ約 10 g、肝臓 (部位 1-5) を 50 g (又は 100 g) を同量の滅菌 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。肝臓表面は滅菌スワブで約 400  $\text{cm}^2$  を拭き取り、スワブを 5 mL の PBS に懸濁し、ストマッカー処理検体を含めそれぞれから 1 mL を取り、1.25 倍の TSB 4 mL に加え、37°C、18 時間、浸透培養

した。2015年10月以降は、50gの肝臓にTSB 50 mLを加えストマック処理し、その後、TBS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。唾液と胆汁についてもそれぞれ1 mLを同様に培養した。増菌後、牛肝臓以外は培養液100 µLを900 µLの滅菌TE buffer (pH 8.0)に加え、100°C、10分間の加熱処理後、遠心分離を行い得られた上清をPCR用の鋳型DNAとした。牛肝臓検体は、増菌培養後1 mLを遠心分離し、ペレットを回収した。ペレットに1 mLのTEを加え100°C、10分間加熱処理し、遠心上清を鋳型DNAとしてPCRに供した。

*stx* 遺伝子検出用のPCR法はPalらの方法に準じて行った (Indian J. Med. Res., 110: 83-85, 1999)。得られたPCR産物は3%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV照射下で特異的な遺伝子の増幅を確認した。

#### (6) 種々の塩素系消毒薬の殺菌効果の比較

##### 6-1: 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、各種塩素系・非塩素系消毒薬を、胆管を通じて肝臓内に注入し、洗浄、殺菌した。尚、消毒薬Aは電解水、B、C、Dは非塩素系消毒薬、Eは塩素系消毒薬を用いた。その後、平成25-27年度分担研究報告書「牛肝臓内の大腸菌の分布とその殺菌法の検討」図6に示したように肝臓を5つの部位、すなわち、部位1-5からそれぞれ約50g (2014年10月より2015年3月まで)あるいは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で希釈後100 µLをMacConkey寒天培地に植菌し、大腸菌群の菌数を測定した。部位1と2は、さらに25g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。ストマッカー処理した液を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で一晩培養した。

##### 6-2: 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°Cで凍結後、チルド条件で融解し、上記と同様に処置した。

#### (7) 畜産食品を原因とする寄生虫性食中毒の発生実態調査

厚生労働省監視安全課食中毒被害情報管理室より、2003年から2012年までの、「その他」が原因物質の食中毒情報を、各事例について提供を受けた。

2003年から2012年の間に発生した食中毒について、事例数および患者数について解析した。食中毒統計において、総数、細菌、ウイルス、化学物質、その他、

不明の項目について、年次推移を解析した。「その他」の占める割合について検討した。

「その他」について、原因物質項目 2009 年から 2010 年にかけて、ヒラメおよび馬肉食中毒の原因が明らかになり、情報が周知され始めた。厚生労働省に届け出される記述には形式が指定されておらず、同一性がない。解析のため、適切な「整理項目名」を定め、記述のものと解析用の項目名を対比して示した。

#### (8) 馬肉と *S. fayeri* 遺伝子検査法

厚生労働省が通知した検査法に従い、馬肉各検体から 0.3 g を 2 か所採取し、ミンチ状とした。TE Buffer でミンチしたサンプルを回収し、1 mL にメスアップした後、30 秒間激しく攪拌、3000 rpm で 5～6 秒間、遠心分離した。上清 200  $\mu$ L を取り、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen) を用いて DNA を抽出した。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。定性 PCR の PCR 条件は 94 $^{\circ}$ C、3 分を 1 ステップ、94 $^{\circ}$ C、30 秒、53 $^{\circ}$ C、30 秒、1 分を 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C、5 分を 1 ステップとした。用いた試薬は 10 $\times$ Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa) である。

同じそれぞれの検体から、馬肉を 10 g、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 (Excel Auto Homogenizer, Nissei) 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 (Quiagen) 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製した。また、定量 PCR の PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C、10 分を 1 ステップ、95 $^{\circ}$ C、30 秒、60 $^{\circ}$ C、1 分を 45 サイクルとした。用いた試薬は GeneAmp SYBR qPCR Mix  $\alpha$  (NIPPON GENE) である。StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

#### (9) エゾシカ肉の住肉胞子虫遺伝子検査

エゾシカ肉 50 検体 (横隔膜部分) は北海道のシカ肉販売業者より分与を受けた。各シカの推定年齢を調査した。

エゾシカ肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法は、厚生労働省が通知した *S. fayeri* 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。

#### (10) 牛肉における住肉胞子虫検査

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 ヶ月齢、すべてメスであった。各牛からそれぞれ筋肉 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。

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。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をシストとして確認し計数した。



厚生労働省が通知した、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法を牛肉に応用した。住肉胞子虫の 18S rRNA 遺伝子を標的とした定性 PCR を実施した。

(11) 放射線照射による牛肝臓からの微生物除去及び副生成物の検討

11-1: 材料 微生物試験用の牛肝臓試料は、東京芝浦食肉処理場にて屠殺直後に凍結した牛肝臓塊(約 6.0 kg)を用いた。これらは購入後、-80℃で保存した。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℃で凍結保存した。

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 50 g 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、氷冷(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。

11-2: 供試菌株

供試菌は、研究機関および研究協力機関が所有する *Escherichia coli* O157 DT66 株(stx-1, 2 陰性)、*Salmonella* Enteritidis (IFO3313、他牛糞便由来株 4 株) および *S. Typhimurium*(IFO12529、他牛糞便由来株 2 株)、*Campylobacter jejuni* 5096 株を用いた。

*E. coli* および *Salmonella* は、Trypticase Soy Broth (Difco)を用いて、37℃一昼夜振とう培養した後、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。*C. jejuni*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。それぞれの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 $10^9 \sim 10^{10}$  CFU/mL となるように調整、これを供試菌液として以降の試験に用いた。

11-3: ガンマ線照射

ガンマ線照射はコバルト 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℃)および凍結(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。

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。

11-4: 牛肝臓の殺菌試験

菌体の接種は、自然解凍した 25 g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液 100 μL 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(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。菌体接種後の試料は、直ちに、ガスバリア袋（PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 90×120mm）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、氷水中あるいは、-80℃の凍結庫内で 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。

照射後の検体は、解凍後直ちに菌数計測した。

#### 11-5：生菌数測定および標的微生物の検出

ガンマ線照射後の牛肝臓は、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。

*E. coli* および *Salmonella* の計数は、各 10 倍段階希釈試料液を、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、これを 35℃で 24 時間培養し、その出現集落数から 1g 当たりの一般生菌ならびに腸内細菌科の菌数を求めた。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、標的菌種であることを PCR 法もしくはイムノクロマト法にて確認した。

*C. jejuni* の計数は、10 倍段階希釈試料液を mCCDA 平板（Oxoid）にスパイラルプレーティング法で塗抹した。mCCDA 平板は 41.5℃で各々 48 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 *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（Singlepath *Campylobacter*; Merck）に供し、典型集落が *Campylobacter* 属であることを確認した。

別途、*Salmonella* の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、37℃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）に一白金耳を各線し、35℃で一昼夜培養した。出現した集落は、それぞれ釣菌し、イムノクロマト法による *Salmonella* 同定キット（Singlepath *Salmonella*; Merck）に供し、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

#### 11-6：TBA 価の測定

TBA（チオバルビツール酸）価の測定は、衣巻らの方法に従い、水蒸気蒸留法により、（一財）日本食品分析センターに委託して実施した。

#### 11-7：牛肝臓の脂肪酸分析

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、クロロホルム/メタノールにより総脂質を抽出した。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（和光純薬（株））により脂肪酸をメチルエステル化し、ガスクロマトグラフにより分析した。（詳細条件は、平成 26 年度分担研究報告書参照）

#### 11-8：2-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、クロロホルム/メタノール（2:1）（C/M）溶液で、脂質を抽出し、これを、アセトニトリルに再溶解させた後、1g のシリカゲルカラム（Merck Silica gel 60 70-230 mesh）2 本に添加し、精製したものを GC-MS の分析試料とした。内部標準としてシクロヘキシルシクロヘキサノンを用い、規定濃度の 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）にマトリックスを添加した標準溶液で作成した検量線を用いて定量した。（試料調製の手順と GC-MS による分析条件の詳細は、本研究の平成 27 年度分担研究報告書参照）

#### 11-9：フランの分析

フランの分析は、Yoshida らの方法により、（一財）日本食品分析センターに委託して実施した。ガスバリア性のポリエチレンバック（PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 90×120mm）含気状態で包装した牛肝臓（50g 程度）を、氷冷状態（0℃）で 6kGy、ドライアイス下（-80℃）で 10kGy 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（約 4℃）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 4 g を入れた 20 ml ヘッドスペースバイアルに 1 g 採取した。（分析条件の詳細については、平成 26 年分担研究報告書を参照）

#### 11-10：臭気成分の分析

牛肝臓は、左葉部分を約 100g の塊に切り分け、ガスバリア袋（PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 180×250mm）に入れ、含気状態のままヒートシールし、予冷の後、3 kGy（0℃）、または 6kGy（-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。

異臭分析は、大和製罐（株）総合研究所に依頼して実施した。解凍直後の試料（40g）を細かく刻み、純水（300mL）とともに減圧蒸留（55℃ 90hPa）し、留分をジエチルエーテルで抽出して濃縮後、臭い嗅ぎ GC 及び GC-MS で分析した。（詳細条件は H25 年度分担研究報告書参照）

（12）高圧処理による牛肝臓及び鶏ササミ中の食中毒菌の不活化に関する検討及び高圧処理による肉質の変化に関する研究

平成 25 年度は、牛肝臓に *E. coli* ATCC25922 株を人工的に接種し、HPV-80C20-S（スギノマシン社製）を用いて、200、300、400、500MPa で 10 分間毎の高圧処理を行った。処理後、PCA 培地による生残菌数の計測と *E. coli* の選択培地である XMG 培地を用いて発育した青色の集落を計測した。処理を行った肝臓については色調計で色調の変化を測定すると共に、硬度の確認を行った。更に、ホルマリン固定及びパラフィン包埋後、病理切片を作成し、HE 染色により光学顕微鏡による肝臓の構造変化について解析した。高圧処理による微細形態変化

の観察は、高圧処理後の検体を 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。

平成 26 年度は、250MPa の高圧処理及び 60 分間毎の圧力時間が *Escherichia coli* と *Salmonella Typhimurium* に及ぼす死滅効果を、*E. coli* ATCC 25922 と *S. Typhimurium* IID 1000 を用いて調べた。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プルに充填し、高圧処理の試料とした。高圧処理装置は平成 25 年度と同じものを用いた。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°C 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*  $10^8$  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 $\mu$ l 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、ストマッカー袋に肝臓 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°C 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°C 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。

平成 27 年度は、高圧処理による鶏ササミ中の食中毒原因菌の不活化の検討を行い、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 $\mu$ lをMH寒天平板及びCCDA寒天平板に塗布後、MH培地は37 $^{\circ}$ C、CCDA培地は42 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ Cで4時間、41.5 $^{\circ}$ Cで44時間微好気培養後にCCDA培地に塗布し、42 $^{\circ}$ C48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ッカー処理して5倍乳剤を作成し、各100 $\mu$ lをBHI寒天平板及びCHROMagarSalmonella平板に塗布後、37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ Cで18時間前増菌培養後、RV培地に接種して42 $^{\circ}$ C22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。同時に高圧処理した検体を10%緩衝ホルマリン液で37 $^{\circ}$ C一夜固定したのち、薄切して再度10%緩衝ホルマリン液にて固定した。パラフィン包埋後、切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。作成した病理組織標本を光学顕微鏡で観察し、高圧処理による組織の変化を観察した。

## C. 研究結果

### （1）諸外国における食肉の生食実態調査

平成25年度のインターネット等による調査の結果、牛肉の生食料理はタイ、韓国、トルコ、フランス、イタリア、チェコ、エチオピアに存在していることが明らかとなった。豚肉の生食料理はドイツ、羊の生食料理はレバノン、馬はフランスで生食されていた。それらによる健康被害は、ドイツ（豚）、オランダ（牛）、トルコ（牛）等で報告されていた。これらのほとんどは、レストラン及び家庭での調理・喫食によるものであったが、ドイツにおける豚の生食料理メットは、容器に包装され、スーパーマーケット等で市販されていた。食肉の生食による健康被害はフランス及びドイツで報告されており、原因物質は病原性大腸菌、サルモネラ、旋毛虫等であった。

平成 26 年の調査では、前年度調査により豚肉の生食製品（メット）がスーパーマーケット等で市販されていることが明らかとなったドイツにおいて、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）牛消化管、肝臓、唾液及び胆汁中の大腸菌群の菌数

牛消化管内、肝臓、唾液及び胆汁の大腸菌群の菌数について 2012 年 11 月から 2014 年 8 月まで調べた結果を平成 25-27 年分担報告書図 1 に示した。唾液、第一胃、十二指腸、盲腸、肛門内容物の菌数はそれぞれ  $10 \sim 10^{10}$  CFU/g であった。一方、肝臓内を 5 つの部位に分けて調べた結果、部位 1 と 2 では、それぞれ 22%、33% で陽性となり、菌数も  $10 \sim 10^6$  CFU/g であった。部位 3-5 では 60% 前後の陽性率で、菌数は  $10 \sim 10^4$  CFU/g であった。胆汁の陽性率は 11% であったが、菌数は  $10^5 \sim 10^8$  CFU/ml と高かった。胆汁中の菌数が多い検体は、肝臓内の菌数も多かった。しかしながら、胆汁からの細菌が検出限界以下 ( $10 > \text{CFU/mL}$ ) の検体でも、肝臓内から細菌が検出される場合もあった。

牛肝臓の各部位における夏場の大腸菌群陽性率は冬場よりも高かった（平成 25-27 年分担報告書図 2、3）。例えば部位 3-5 は、冬場は 40-50% であったが、夏場の陽性率は 80% 前後であった。一方、部位 1 と 2 では、夏場の陽性率はそれぞれ 32%、46% であったが、冬場はそれぞれ 13%、25% であった。肝臓内で検出された大腸菌群の菌数は季節に関係なく胆汁で高濃度の菌が検出された場合を除けば、部位 1 と 2 では  $10^2$  CFU/g 以下、部位 3-5 では  $10^3$  CFU/g 以下であった。Sawdust Liver（鋸屑肝）についても同様に調べた結果、部位 1 と 2 の大腸菌群の陽性率は 50% と 60%、部位 3-5 の陽性

率は 80-85% と共に高かった。菌数も 3.3 ~ 10<sup>7</sup> CFU/g が検出され、Sawdust Liver では大腸菌群の陽性率のみならず菌数も多かった（平成 25-27 年分担報告書 図 4）。

### （3）牛肝臓から分離した細菌の菌種同定

牛肝臓内から分離した菌の 16S rRNA 遺伝子約 500 bp の塩基配列を解析した結果、*Escherichia* sp, *Klebsiella* sp, *Serratia* sp, *Citrobacter* sp 等腸内細菌科に属する細菌として同定された。

### （4）組織化学的解析による牛肝臓内の細菌汚染部位の同定

69 検体の肝臓の細菌汚染部位を組織化学的に調べた結果、13 検体で胆管内又は門脈／類洞内に細菌が検出された。胆管内に検出された 1 例を平成 25-27 年報告書図 5-1 に、類洞内に検出された 1 例を同図 5-2 に示した。類洞内に細菌が検出された場合、図 6 に示した部位 3-5 の加熱用として提供されていた部位がほとんどであるが、まれに 1 と 2 の生食用として提供されていた部位からも検出された。しかしながら細菌が検出された周辺部位にマクロファージの集積や炎症が認められなかったことから屠畜解体後に何らかの理由で肝臓内が汚染された可能性も考えられる。

### （5）牛消化管、肝臓内、胆汁における *stx* 遺伝子の検出

牛消化管、肝臓から *stx* 遺伝子を PCR 法で検出した結果を平成 25-27 年度分担

報告書表 1 にまとめた。胆汁では調べた 232 検体全てで検出されなかった。肝臓の内部（253 検体）と表面（181 検体）からは、それぞれ 1.2%、8.8% の割合で検出された。舌の陽性率は 6.5%、唾液は 22%、第一胃内容物は 8.7%、十二指腸は内容物で 15%、組織で 5.9%、盲腸は内容物・組織とも 26%、肛門は内容物で 45%、組織で 83% と第一胃から肛門に近づくに従い陽性率は上昇し、肛門においては内容物よりも組織での陽性率の方が高かった（平成 25-27 年度分担報告書表 1）。

一方、肝臓の部位別で見てみると、0.5 g/1.0 g 相当の増菌培養液から肝臓内部の部位 1（201 検体）と 2（205 検体）、すなわち生食用として提供されていた部位からは *stx* 遺伝子は検出されなかったが、加熱用として提供されていた部位 3（200 検体）、4（191 検体）、5（191 検体）からはそれぞれ 1、3、1 検体から *stx2* 遺伝子が検出された。肝臓表面では 133 検体中 9 検体から *stx2* 遺伝子が、1 検体から *stx1/2* 遺伝子が検出された。Sawdust Liver では肝臓内部と胆汁それぞれ 20 検体について調べた結果、部位 3 と 5 のそれぞれ 1 検体で *stx2* 遺伝子が検出された（平成 25-27 年度分担報告書表 2）。さらに、50 g 相当の肝臓を増菌培養した検体では、調べた 48 検体全てで左葉（生食用として提供されていた部位 1 と 2）、右葉（加熱用として提供されていた部位 3-5）、胆汁では調べた 36 検体全てで *stx* 遺伝子は検出されなかった（表 3）。一方、肝臓表面からは 6 検体で *stx2* 遺伝子が検出された。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。

#### (6) 種々の塩素系消毒薬の殺菌効果の比較

6-1：肝臓を5つの部位に分けた場合の大腸菌群細菌数と塩素系消毒薬の殺菌効果

5種類の消毒薬(2種類の塩素系[消毒薬AとE]と3種類の非塩素系[消毒薬B、C、D])の殺菌効果を調べた結果を平成25-27年度分担報告書表4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での大腸菌群陽性率は26%と23%、消毒薬Eの場合、それぞれ0%で、消毒薬B-Dの56%-86%と比べて低かった。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、消毒薬と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平成25-27年度分担報告書表5に示した。凍結融解後2次増菌した場合、生食用として提供されていた部位1と2とで冬場では40-48%、夏場では60%で腸内細菌科菌群が検出された。言い換えれば、それぞれ50-60%、40%では腸内細菌科菌群が全く検出されなかった。一方、消毒薬B、C、Dでは凍結融解後の腸内細菌科菌群の陽性率が90-100%であった。

6-2：肝臓を左葉、右葉で分けた場合

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左葉(部位1と2)

と加熱用として提供されていた右葉(部位3-5)に分け、2.5gを10カ所から採取した結果を平成25-27年度分担報告書表6にまとめた。最も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、すなわち、2,000ppmと500ppmで評価した。その結果、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。凍結することで左葉の陽性率は33%まで下がったが、2次増菌を行うと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(平成25-27年度分担報告書表6)。しかしながら、消毒薬Eを用いた場合、凍結無しで左葉の陽性率は8%であったのに対し右葉では33%であった。左葉では凍結後、2次増菌を行うことで陽性率は50%となった。

#### (7) 畜産食品を原因とする寄生虫性食中毒の発生実態調査

寄生虫性食中毒が包有される「その他」に分類される食中毒は、2007年までは年間で一桁の発生件数を示したにすぎない。2008および2009年は17件と、いずれも少ない発生数になっている。2010年に28件となり、増加傾向を示し、2011年は68、2011年に至っては100件を越える事件数を示した。ヒラメ及び馬肉食中毒の原因が明らかになったこともあり、2010年から2011年を境に、急激な「その他」の食中毒が増加していることが読み取れる(平成25年度分担報告書表2)。

10年間で266件の発生がみられているが、そのうち、寄生虫が原因となってい



るのは258件あり、97%を占めた。細菌性、毒素性、混合した原因によって「その他」に分類された食中毒はわずかに3%に過ぎなかった。

2003年から2010年までは、3事例を除き、すべてが、アニサキス属が原因となっていた。2011年になると、アニサキス属を越えるクドアの報告、また、サルコシスティスが原因になっている事例の発生がみられている。2012年は、アニサキスは倍増し、また、クドアも発生件数が増加した(平成25年度分担報告書 表3)。

#### (8) 馬肉と *S. fayeri* 遺伝子検査法

*S. fayeri* の18S rRNA 遺伝子を標的とする定量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(平成26年度分担報告書 表4)。遺伝子陰性と判定された1番の検体で、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、3番および4番の検体では、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3番から馬肉10gを8か所採取し、均質化後、DNAを抽出した。陽性検体7番からは馬肉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。

#### (9) エゾシカ肉における住肉胞子虫遺伝子検査

エゾシカ肉よりDNAを抽出し、住肉胞子虫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、住肉胞子虫18S rRNA 遺伝子の増幅が確認された。

#### (10) 牛肉中の住肉胞子虫検査

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(平成27年度分担報告書 図3)。シストの形態は *S. cruzi* を推定させた。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(平成27年度分担報告書 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、1cm<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。

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。馬肉について検討された現行法を応用したところ、約1,100

bp の DNA の増幅が確認された。DNA サイズが同様で、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た住肉胞子虫の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。

牛肉中の住肉胞子虫について、顕微鏡による検査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、それらの中の 7 検体から住肉胞子虫の遺伝子増幅が確認され、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果が大きくかい離していた。

#### (11) 放射線照射による微生物除去

11-1 : 各種細菌に対するガンマ線の殺菌効果

##### 11-1-1 : *E. coli* O157

牛肝臓および牛挽肉中に、*E. coli* O157 DT66 株を接種し、段階的に線量を変えて照射し、生残曲線を得た。牛肝臓及び挽肉中の DT66 株は、氷冷条件 (0°C) 0~3 kGy、凍結条件 (-80°C) 0~5 kGy の範囲で、線量に対して指数関数的に減少し、生残菌数の線量に対するプロットは、ほぼ直線となった。このプロットの傾きから、D<sub>10</sub> 値を求めた結果は、平成 25 年度報告書分担研究報告書 表 1 に示した。牛肝臓内部に接種した腸管出血性大腸菌 O157:H7 DT-66 株の D<sub>10</sub> 値は、氷冷 (0°C) 含気条件で 0.36 kGy、脱気条件で 0.38 kGy、凍結 (-80°C) 含気条件で 0.80 kGy、脱気条件で 0.96 kGy であった。氷冷・凍結もしくは含気・脱気包装いずれの試験

区においても、牛肝臓におけるガンマ線殺菌では牛挽肉と比較して高い線量を必要とする結果となった。特に凍結下では挽肉と比較して D<sub>10</sub> 値が高く算出された。また、氷冷区と凍結区を比較した場合、凍結区の D<sub>10</sub> 値の方が高く観測された。さらに含気包装区と真空包装区においても比較したところ、殺菌のためには真空包装区の方が含気包装区と比較して高い線量が必要であった。

##### 11-1-2 : *Salmonella*

サルモネラ供試菌 8 株に対し、リン酸緩衝液中におけるガンマ線の感受性について比較したところ、1 kGy 照射後の生残率は *S. Enteritidis* IFO3313 株が供試菌株の中で最も高かった(平成 25 年 分担研究報告書図 1)。そこで、この株を被検菌として選択し、以降の実験に用いた。

*S. Enteritidis* IFO3313 株を被検菌として、牛肝臓および牛挽肉中に接種し、ガンマ線照射を行った際の生残曲線は、低線量域で肩が見られるシグモイド型となったが、(平成 25 年度分担研究報告書図 2)、便宜的に指数関数型であるとして D<sub>10</sub> 値を、直線回帰より求めた。(平成 25 年度分担研究報告書 表 2 および平成 27 年度分担研究報告書 表 1)。研究期間を通じての結果を統合すると *S. Enteritidis* IFO3313 株を、牛肝臓中での D<sub>10</sub> 値は、氷冷 (0°C) 含気条件で 0.62 kGy、脱気条件で 0.63 kGy、凍結 (-80°C) 含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy と求められた。これらの値は、前項で示した腸管出血性大腸菌 O157 の値よりも高く、サルモネラの殺菌にはより大きな線量が必要であった。また、腸管出

血性大腸菌 O157 と同様、牛肝臓におけるガンマ線殺菌では牛挽肉と比較して高い線量を必要とする結果となった。照射温度、包装条件による放射線感受性の違いについても、腸管出血性大腸菌 O157 と同様、凍結下、脱気条件の方が、放射線抵抗性が強く (D<sub>10</sub> が大きく) なった。

#### 11-1-3 : *Campylobacter*

牛肝臓および牛挽肉中において *C. jejuni* 5096 株を接種し、ガンマ線照射を行った際の D<sub>10</sub> 値を求めた (平成 26 年度分担研究報告書 表 1)。*C. jejuni* の牛肝臓中の D<sub>10</sub> 値は、氷冷 (0°C) 含気条件で 0.26 kGy、脱気条件で 0.33 kGy、凍結 (-80°C) 含気条件で 0.58 kGy、脱気条件で 0.69 kGy であり、大腸菌株よりも低い結果を得た。また、牛肝臓における D<sub>10</sub> 値はいずれの条件においても、牛挽肉中の値よりも大きかった。なお、-80°C で凍結した検体では、凍結および解凍の時点で本菌の菌数が 1 ケタ低下し、これは牛肝臓・挽肉共に観察された。

#### 11-1-4 : ガンマ線による *Salmonella* 死滅効果

前項までで最も放射線抵抗性が強いと考えられた *S. Enteritidis* IFO3313 株を約 10<sup>5</sup> 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 となるようガンマ線照射した場合の不活性化について検討を行った。各条件における、5 検体中の検出 (陽性) 数は、平成 27 年分担研究報告書 表 2 に記載した。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。なお、本

試験にて接種した菌数は 3.0 x 10<sup>5</sup> CFU/g と求められた。

#### 11-2 : 牛肝臓のガンマ線照射による副生成物

##### 11-2-1 : TBA 価

牛肝臓を含気あるいは脱気条件で包装し、氷冷 (0°C) で 3、6 kGy、凍結状態 (-80°C) で 5、10 kGy のガンマ線照射を行い、脂質の過酸化と相関があるとされる TBA 価を測定した。含気包装では、氷冷 (0°C) 照射において TBA 価の線量に応じた有意な増加が認められた。含気包装、凍結状態 (-80°C) の照射においても統計的に有意な TBA 価の増加がみられたが、その変化量は非常に小さかった。また、脱気包装では、氷冷、凍結照射ともに、最高線量の照射でも有意な TBA 価の増加は認められなかった。(H26 年度分担研究報告書 表 3)

##### 11-2-2 : 脂肪酸組成、トランス脂肪酸含量

前項と同様の照射条件において、主な脂質構成脂肪酸の含量を測定した。供試した牛肝臓には、主な構成脂肪酸として、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1-9c)、パルミチン酸(16:0)、リノール酸(18:2-9c,12c)、アラキドン酸(20:4)などが含まれていた。また、含有量は少ないが、不飽和脂肪酸では、バクセン酸(18:1-11t)のほか 18:1,18:2 などの炭素数 18(C18) のトランス異性体の他、C14~C17 のモノエンのトランス異性体も非照射及び照射のいずれの検体にも含まれていた。照射による不飽和脂肪酸の有意な減少は、い

ずれの検体においても認められなかった (H26 年分担研究報告書 表 3)。

ガンマ線照射によって、いずれの照射条件の試料でもトランス異性体がわずかに増加した。特に 0°C の照射では線量に応じた増加が顕著で、6 kGy の照射では 18:1 および 18:2 のトランス異性体の総量や C18 のトランス異性体の総量、より短鎖のトランス異性体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。脱気包装、0°C、6 kGy 照射における、C18 総トランス脂肪酸の含量は、 $1.40 \pm 0.03$  g / 100 g 脂質 (非照射コントロールは  $1.04 \pm 0.08$  g / 100 g 脂質)、その他の脂肪酸も合わせた総トランス脂肪酸量は、 $2.51 \pm 0.10$  g / 100 g 脂質 (非照射コントロールは  $2.18 \pm 0.12$  g / 100 g 脂質) となった。また、凍結下の照射でも氷冷下に比べ変化量は小さいものの照射によるトランス異性体の増加の傾向が認められた。脱気包装 10kGy での増加量は統計的に有意で、C18 総トランス脂肪酸の含量は、 $1.26 \pm 0.05$  g / 100 g 脂質、その他の脂肪酸も合わせた総トランス脂肪酸量は、 $2.42 \pm 0.10$  g / 100 g 脂質であった。なお、本研究で使用した牛肝臓の脂質含量は、5.03 g / 100 g 肝臓生重量 であった。含気包装と脱気包装の同一温度、同一線量での間のトランス異性体含量を較しても、統計的な有意差は認められず、TBA 価の場合と異なり、包装条件の違いによる影響はほとんど認められなかった。(H26 年分担研究報告書 表 2)

#### 11-2-3 : 2-アルキルシクロブタノン類

肝臓成分の寄与による分解反応を考慮して、抽出溶媒をクロロホルム/メタノールとし、定量時にマトリックス検量線を用いる方法により、照射した牛肝臓 (凍結(-80°C)照射、5、10 kGy、氷冷 (0°C)照射 3、6kGy) において、3種の 2-ACBs (2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB) の定量を実施した。添加回収試験による回収率は 73~116% で、繰り返し標準偏差は 6% 未満であった。

非照射の肝臓には、いずれの 2-ACBs も検出されず、照射した肝臓では、パルミチン酸由来の 2-dDCB、ステアリン酸由来の 2-tDCB、オレイン酸由来の 2-tDeCB が線量に依存して生成し、たとえば含気包装、凍結状態 (-80°C) 10 kGy における、含量は、 $10.3 \pm 0.30$ 、 $30.7 \pm 0.5$ 、 $55.5 \pm 1.6$  ng / g 生重量であった。他の条件の照射においても、照射肝臓中の 3 種の 2-ACBs の含量は、元の脂質の脂肪酸組成を反映し、2-tDeCB、2-tDCB、2-dDCB の順に高い含量の 2-ACBs が検出された。

(詳細生成量については H27 分担研究報告書 表 4 参照) 肝臓生重量 1g・1 kGy あたりの生成量は、2-tDCB が 2-dDCB に比べて大きく、-80°C に比べて 0°C 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°C 照射における生成量が 0°C 照射の場合に比べて著しく大きくなった。また、-80°C 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。前駆脂肪酸 1 mmole あたり 1 kGy の照射で生成する 2-ACBs の分子数は、0.3~0.9 nmole 程度であった。(H27 分担研究報告書 表 5 参照)