

つ検査している。実際の検査対象の多くは、牛、豚、および鶏になる。それらの家畜・家禽は、肉眼による検査および必要に応じた精密検査を経たのち、市場流通する。畜産食品を通じて人に危害性を示す物質や微生物が、検査所での精密検査をすり抜け、あるいは途中で混入し、さらには増殖などして、人が畜産食品を喫食し、食中毒が発生する。食中毒に関する公的な記録は、厚生労働省が所轄している食中毒統計になる。平成24年に原因物質の追加がされ、食中毒統計は刷新され、より正確な、我が国の食中毒発生状況が把握できるようになった。この追加の契機となった事象の一つに、馬肉食中毒の原因が発見されたことがある。馬肉の生食、すなわち馬刺しを喫食すると、短時間で、下痢嘔吐を示し、1日あるいは数日で回復するという病型を示す「馬肉食中毒」は、馬の筋肉内に寄生する *Sarcocystis* 属住肉胞子虫という寄生虫が原因だった(1)。他に、原因が長く不明だったヒラメ食中毒が解析され、これもクドア属粘液胞子虫が原因物質であり(2)、これらの事実に基づき、上記食中毒統計の変更、すなわち、寄生虫(クドア、サルコシステイス、アニサキス、その他の寄生虫)が病因物質の項目として追加された。

馬肉食中毒を診断する際、厚生労働省はその検査法を通知している(3)。*Sarcocystis fayeri* フェイヤー住肉胞子虫を、患者喫食馬肉から検出するのであるが、顕微鏡を用いての方法と、住肉胞

子虫に共通な、18S rRNA 遺伝子を標的とした定性 PCR 法が提示されていた。馬肉を喫食しての事例を、*Sarcocystis* 属寄生虫が原因であることを確定させる方法である。提示された方法は、事例の診断に適応させたもので、馬肉を含め、住肉胞子虫を含んだ畜産食品の、食中毒危害性を評価できる方法かは検証されていない。

住肉胞子虫は肉食動物を終宿主とし、草食動物あるいは豚のような雑食動物が中間宿主となって、その寄生環を維持している(図1)。住肉胞子虫は、その名が示すように、中間宿主の筋肉内に寄生する。終宿主に感染能力のある成熟虫体をブラディゾイトとよび、それが多数、袋に包まれて、筋肉内に存在する。袋はシストと称され、住肉胞子虫の種に応じた種々の個性ある構造を示す。畜産食品のもととなっている家畜には、住肉胞子虫が寄生する。家畜以外の野生動物も例外でなく、シカ、イノシシには住肉胞子虫の寄生が報告されている。

本研究は、畜産食品の安全性確保を大きな目的とし、以下の項目が具体的な目的となっている。

1) 原因食品として畜産食品を含め、我が国における寄生虫性食中毒の、統計的実態を明らかにする。平成23年までは寄生虫性食中毒が項目化されておらず、それは「その他」に分類されていた。平成24年度からは、届出があった中での実態が把握できるので、寄生虫性食中毒の位置づけを明らかにする。

2) 食中毒診断を目的としている馬肉を

検査対象とした住肉胞子虫の検査法を、食中毒危害性を評価できる方法として使用可能か、検証する。また、改良する。

3) 家畜だけでなく野生動物も畜産食品として流通する。その流通は、駆除とリンクし、今後増加する可能性がある。野生シカ肉について、住肉胞子虫寄生状況を把握する。

4) 住肉胞子虫が寄生する動物種は多い。中間宿主の一つとしてウシがある。現在まで、日本において牛肉に寄生する住肉胞子虫が原因で食中毒が発生した事例は報告されていない。牛肉における住肉胞子虫の寄生状況を把握する。

B. 実験方法

B-1 食中毒統計における寄生虫性食中毒

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。厚労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。

B-2 馬肉と *S. fayeri* 遺伝子検査法

厚生労働省が通知した検査法(3)に従い、馬肉各検体から0.3g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、1mLにメスアップした後、30秒間激しく攪拌、3000rpmで5~6秒間、遠心分離した。上清200μL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(表1)。定性PCRのPCR条件は94°C、3分を1ステップ、94°C、30秒、53°C、30秒、1分を30サイクル、72°C、5分を1ステップとした。用いた試薬は10×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10g、2か所採取し、ぶつ切りにしたものにPBS 30mL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200μL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(表1)。また、定量PCRのPCR条件は95°C、10分

を1ステップ、95°C、30秒、60°C、1分を45サイクルとした。用いた試薬はGeneAce SYBR qPCR Mix α (NIPPON GENE) である。StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

B-3 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。

B-4 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ヵ月齢、すべてメスであった。各牛からそれぞれ筋肉8~9ヵ所、計52ヵ所を採材した。採取部位は、心筋、横隔膜筋、咬筋、ネック、カタ、リブロース、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(3)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。

C. 結果

C-1 「その他」に分類される食中毒の位置づけ、その原因物質の分析

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(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、サルコシステイ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(表3)。

C-2 馬肉の住肉胞子虫遺伝子検査法改良の検討

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 10 g を均質化して検査に供する方法の比較を行った (表 4)。遺伝子陰性と判定された 1 番の検体で、馬肉 0.3 g 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 10 g 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 10 g を均質化する方法で、0.3 g 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 10 g 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 0.3 g 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 10 g を均質化する方法では、馬肉 0.3 g を用いる方法よりも、低い rSD を示した (図 2)。

C-3 エゾシカ肉における住肉胞子虫汚染状況

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。

C-4 牛肉中の住肉胞子虫の顕微鏡および遺伝子検査

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 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 (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 か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 cm² 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、それらのうちの 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。

D. 考察と結論

畜産食品の寄生虫に関連する危害性の分析を行った。

食中毒統計が改正される平成23年までは、寄生虫性食中毒は「その他」に分類されていた。個票を検索してその他を分析したところ、97%が寄生虫を原因としていて、そのほとんどがアニサキスだった。統計の項目の改正後は、アニサキスが原因の食中毒が増加していたとともに、クドアが原因である事例も多く発生していた。アニサキス食中毒は、単に発生が増加しているとは考えにくい。寄生虫性食中毒に関心が集まり、医師、保健所および衛生検査所の担当員による、検査体制の整備と精度が向上し、アニサキス食中毒事件数の実態が把握できている可能性がある。事件数においては、寄生虫性食中毒は、ウイルス性、細菌性に次いで多く発生している食中毒となっている。

現行の住肉胞子虫遺伝子検査法に基づき0.3gの馬肉を採取し、DNAを抽出、定量PCRに用いる場合、遺伝子コピー数のばらつきは非常に大きいことがわかった。馬肉10gを均質化後、DNAを抽出し、定量PCRに用いる方法で、よりばらつきの少ない結果が得られた。

コンピュータソフト上で、20、30、あるいは40gと、検体の重量を増やし、同様な解析を行ったところ、ばらつきは減少した。検体量の増加は、可食部を少なくすることに直結し、また、作業上の困難さを増やすので、適正な判断が要

求される。

北海道に生息するエゾシカについて、住肉胞子虫の汚染状況を調査した。その結果、96%のエゾシカ肉中から住肉胞子虫遺伝子が検出され、同胞子虫の汚染が蔓延している危険性が推察された。エゾシカ肉が食用に転用される実績がすでにあり、今後、大きく発展する可能性がある。実際、加熱が不十分のエゾシカ肉を喫食して、有症苦情事例が発生し、患者喫食エゾシカ肉中には住肉胞子虫が検出されていることを踏まえてエゾシカ肉中における住肉胞子虫の危害性を評価する必要がある(4)。

現行の馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法を、牛肉に適応し、その妥当性を検討した。

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。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べきと推察する。

牛肉中の住肉胞子虫についての遺伝子検査法を検討した。馬肉を対象とした現行法を応用した場合、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、牛肉にも適応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、適応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ず、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かい離した。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、DNAを抽出する検体の量を増加させ。また、定量性のある遺伝子検査法の必要性が示唆された。

平成26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、大量の検体を均質化することの有効性を示した。牛肉についても、*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。*S. cruzi*の病原性に関する知見の集積も今後必要である。

E. 参考文献

- 1) Kamata, Y., Saito, S., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, T., Inui, T., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y. 2014. A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible

for food poisoning. J. Food Prot. 77, 814-819.

- 2) Kawai, T., Sekizuka, H., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. 2012. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. Clin. Infect. Dis. 54, 1046-1052.
- 3) *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
- 4) 青木佳代、石川和彦、林 賢一、斉藤守弘、小西良子、渡辺麻衣子、鎌田洋一：シカ肉中の *Sarcocystis* が原因として疑われた有症苦情、食品微生物学雑誌、90、28-32、2013.

F. 研究発表

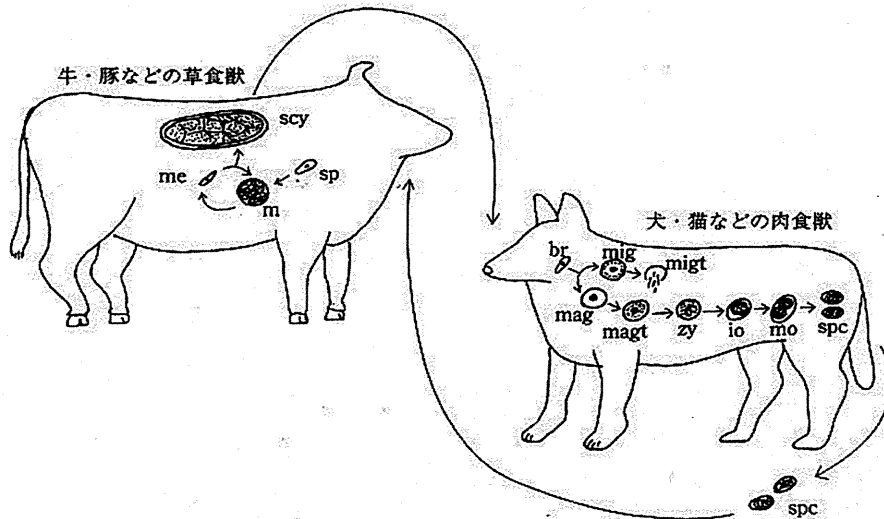
- 1) 鎌田洋一、わが国における寄生虫性食中毒の発生状況—厚生労働省食中毒統計からの解析—、食品衛生研究 65, 25-31, 2014.

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：マイクロガモント，migt：マイクロガメート，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

最新家畜寄生虫病学（板垣 博、大石 勇監修：朝倉書店、東京、2009.）から引用した。

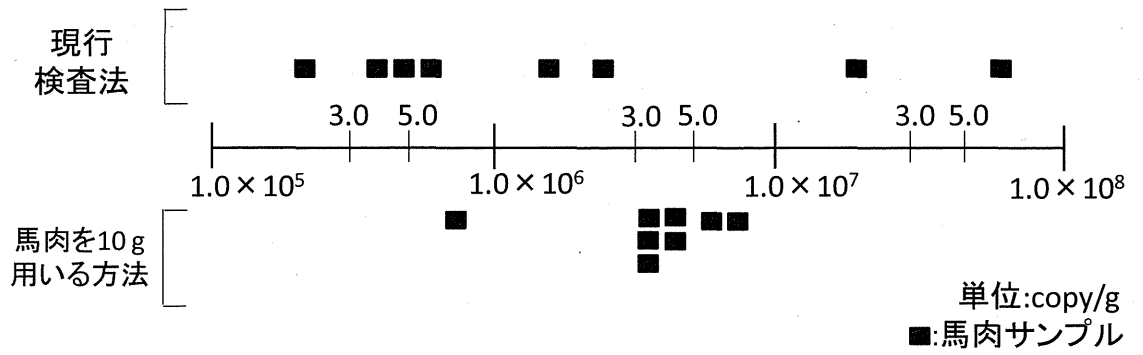


図2. 現行検査法および馬肉 10 g 用いる方法での定量 PCR の結果のばらつき



図3 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。

表 1. 定量 PCR で用いた *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子を検出用プライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物 サイズ (bp)
<i>Sarcocystis</i> qRT-1F	GATACAGAACCAATAGGGACATCAC	140
<i>Sarcocystis</i> qRT-3R	ACTACCGTCGAAAGCTGATAGG	

表2 厚生労働省食中毒統計 事件数の推移

	事件数									
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
総数	1,585	1,666	1,545	1,491	1,289	1,369	1,048	1,254	1,062	1,100
細菌	1,110	1,152	1,065	774	732	778	536	580	543	419
ウイルス	282	277	275	504	348	304	290	403	302	432
化学物質	8	12	14	15	10	27	13	9	12	15
自然毒	112	151	106	138	113	152	92	139	69	97
その他	1	5	8	7	8	17	17	28	68	107
不明	72	69	77	53	78	91	100	95	68	30

表3 寄生虫性食中毒の発生件数の推移

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
寄生虫性	1	5	7	5	7	14	17	28	67	107
アニサキス属	1	4	7	5	6	14	16	28	32	65
クドア	0	0	0	0	0	0	0	0	33	41
サルコシステイス	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
ウェステルマン肺吸虫	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
旋尾線虫	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

表 4. 現行検査法と馬肉 10 g を均質化する方法での定量 PCR

Sample No.	現行検査法			馬肉 10 g を用いた方法		
	18S rRNA gene (copy/g)	SD	rSD	18S rRNA gene (copy/g)	SD	rSD
1	1*	Undetected		10304000		
	2*	Undetected		11651	7277790	141.1%
3	1*	7015800		13265600		
	2*	4330920	1898497	20798400	5326494	31.4%
4	1*	4370520		13830400		
	2*	6993360	1854628	14838400	712763.6	5.0%

*1 サンプルあたり duplicate で実験し、SD および rSD を算出した。

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：牛消化管内の大腸菌群の分布を調べたところ、牛の唾液から肛門に至る各部位で 100%検出され、肛門に近づくに従いその菌数は多くなった。牛胆汁および牛肝臓内の大腸菌群の分布は相関性のある場合とない場合があった。肝臓内で細菌が検出された場合、その多くは胆管であったが、一部類洞でも検出された。牛の肝臓内を 5 カ所に分け大腸菌群の分布を調べた結果、陽性率は部位 1 と 2（生食用として提供されていた）と比べ、部位 3-5（加熱用として提供されていた）の方が高く、冬場よりも夏場の方が高かった。種々の消毒薬を用いて牛肝臓内の大腸菌群あるいは腸内細菌科菌群に対する殺菌効果を調べたところ、消毒薬と凍結融解を組合せることにより、部位 1 と 2 から冬場：50-60%、夏場：40%で腸内細菌科菌群が検出されなかった結果が得られた。6 肝臓検体を増菌培養し PCR 法で *stx* 遺伝子を検出したところ、部位 3-5 と肝臓表面では *stx* 遺伝子が検出されたが、部位 1-2 からは *stx* 遺伝子は検出されなかった。

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。しかし、生レバーの需要は大きく、生レバーの復活を求める人も少なくない。一方、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。

本研究では、牛肝臓内の大腸菌群の分布を明らかにし、その殺菌法を開発することを目的として以下の実験を行った。すなわち、牛肝臓内の STEC を含む大腸菌群（乳

糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性好気性又は通性嫌気性桿菌で、マッコンキー寒天培地でコロニーを形成する菌）あるいは腸内細菌科菌群（グラム陰性の通性嫌気性桿菌でブドウ糖を発酵し酸とガスを産生する菌で、VRBG 寒天培地でコロニーを形成する菌）の汚染は胆管を經由していると仮定し、塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせた殺菌法の開発を試みた。屠畜解体後の牛肝臓内の大腸菌群の分布、唾液、胆汁を含む牛消化管内での大腸菌群と STEC の分布を調べた。開発した殺菌法で屠畜解体後の牛肝臓内の腸内細菌科菌群の殺菌を試みた。

B. 研究方法

1. 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。その他表 1 に示した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。

2. 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。

3. 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 μm 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。

4. 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 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、50 g 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。

5. 種々の塩素系消毒薬の殺菌効果の比較

5-1. 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、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 50 g (2014 年 10 月より 2015 年 3 月まで) あるいは 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 で希釈後 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。部位 1 と 2 は、さらに 25 g 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。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 $^{\circ}$ 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 で一晩培養した。

5-2 : 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、肝臓左葉に関しては 10 カ所から 2.5 g ずつ採取し合計 25 g を -30 $^{\circ}$ C で凍結後、チルド条件で融解し、上記と同様に処置した。

C. 研究結果

1. 牛消化管、肝臓、唾液及び胆汁中の大腸菌群菌数

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 10¹⁰ 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 10⁶ 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 10⁴ CFU/g であった。胆汁の陽性率は 11% であったが、菌数は 10⁵ \sim 10⁸ 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 $>$ 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 (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 10² CFU/g 以下、部位 3-5 では 10³ 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 \sim 10⁷ 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 (図 4)。

2. 牛肝臓から分離された細菌の菌種同定

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。

3. 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 例を図 5-1 に、類洞内に検出された 1 例を図 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。

4. 牛消化管、肝臓内、唾液及び胆汁における *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 (表 1)。

一方、肝臓の部位別で見ると、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。Sawdaust 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 (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。

5. 塩素系消毒薬の牛肝臓内大腸菌群、腸内細菌科菌群に対する殺菌効果

5-1. 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。

5-2：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（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。

D. 考察

牛の肝臓内から検出される大腸菌群の由来を調べる目的で、牛の消化管内、胆汁、

牛肝臓内の大腸菌群細菌の分布について調べた。その結果、唾液から肛門に至るまで調べた全ての部位から大腸菌群は検出された。大腸菌群の菌数は、第一胃から肛門に近づくに従い増加した。一方、胆汁の陽性率は11%で、肝臓内の陽性率は22%から63%と胆汁よりも高い陽性率を示した。このことは胆汁が必ずしも肝臓内の大腸菌群の汚染源となっていない可能性を示している。但し、高濃度の大腸菌群が胆汁で検出された場合、肝臓内でも比較的高濃度の大腸菌群が検出されたので胆汁も主要な汚染源の1つであることに間違いはない。一方、大腸菌群が検出された肝臓の切片を作製し、組織化学的に肝臓内での菌の汚染部位を調べたところ、一つは胆管、もう一つは門脈や類洞等の血管で検出された。すなわち、胆管以外にも血管が汚染源となっている可能性が示唆された。肝臓を牛個体から切り離した際、門脈の切断部位は肝臓表面に露出しており、部位3-5は損傷を受けている場合も多々あり、門脈を含め損傷を受けた部位を介して汚染する可能性は十分あると考えられる。したがって、屠畜解体後の肝臓の内部が汚染しないよう門脈部分の衛生的な取り扱いが重要である。

牛肝臓内の大腸菌群の陽性率及び菌数を季節別に解析した結果、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3-5とも夏場でそれぞれ32-46%、77-81%であるのに対し、冬場ではそれぞれ13-25%、42-50%であった。胆汁中に大腸菌群が高濃度で検出された場合を除けば、季節に関係なく肝臓内の大腸菌群の菌数は部位1と2（生食用として提供されていた）で 10^2 CFU/g以下、部位3-

5 (加熱用として提供されていた) では 10^3 CFU/g 以下であった。一方 Sawdust Liver では、部位 1 と 2 の大腸菌群の陽性率は 50-60%、部位 3-5 で 80-85% と高い値となり、さらに、汚染菌数も胆汁からの汚染の影響を受けているとはいえ 10 から 10^7 CFU/g と高い値を示した (図 4)。牛肝臓内から分離した大腸菌群の 16S rRNA 遺伝子を解析し菌種を同定した結果、*Escherichia* 属、*Citrobacter* 属、*Klebsiella* 属、*Serratia* 属菌であった。このことは、肝臓内の細菌汚染は腸管内あるいは胆汁を介している可能性が強く示唆された。

最も重要な点は、牛肝臓内に STEC が存在するかどうかである。そこで、牛肝臓内に STEC が存在するかどうか、もし存在するとすればその汚染源はどこなのかを調べる目的で牛の各消化管部位における *stx* 遺伝子の分布について調べた。*stx* 遺伝子は唾液でも 22% で陽性となり第一胃内容物から肛門に近づくに従って陽性率は高くなった。肛門では内容物より組織の方でより高率に *stx* 遺伝子が検出された。しかしながら、胆汁では調べた 232 検体全て陰性であり、肝臓内部も生食用として提供されていた部位 1 と 2 では全て陰性、陽性となったのは加熱用として提供されていた部位 3-5 と外部からの汚染を受けやすい部位であった。実際、肝臓表面の汚染率は 8.8% と高く、部位 3-5 の汚染も門脈あるいは損傷を受けた部位から起こっていることも考えられる。すなわち、牛肝臓内の STEC 汚染は屠畜解体後の糞便汚染の影響を受けている可能性がある。一方、表 2 で示した結果は、0.5 g/1 g 当たりで検出されたかどうか、表 3 に示した結果では 50 g 当たり検出されたかどうか

かという結果である。スパイク実験を行い、それぞれの検出下限を調べた結果、0.5 g/1 g では 62 CFU/50 g、50 g では 6.2 CFU/50 g であった。一方、2 次増菌後に腸内細菌科菌群が検出された検体を用いても PCR 法で *stx* 遺伝子が検出されなかったことから、肝臓内部 (部位 1 と 2) における STEC 汚染の可能性は低いと予想される。

肝臓内の大腸菌群、腸内細菌科菌群を種々の消毒薬と凍結融解法を組み合わせることで各種消毒薬の殺菌効果を評価したところ、消毒薬の種類によって差が有ることがわかった。現状での塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせただけでは完璧ではないが、一連の処理後、腸内細菌科菌群を検査することにより、陰性となったものだけを流通させることができれば生レバーを提供できる可能性もゼロではない。生レバーを提供できる可能性を見いだすためにも、牛肝臓内での腸内細菌科菌群の分布、STEC が存在する可能性についてさらに検体数を増やして、データを積み上げて慎重に議論する必要がある。

E. 結論

牛肝臓内の腸内細菌科菌群汚染は胆管あるいは血管を介していると考えられる。汚染率には季節性があり、冬場に少なく夏場に多い傾向であった。塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせることである程度の殺菌効果は認められたが、現状では十分でなく更なる検討が必要である。

一方、胆汁や部位 1 と 2 からは *stx* 遺伝子は検出されず、肝臓表面や部位 3-5 から *stx* 遺伝子が検出されたことから、牛肝臓内の STEC 汚染は屠畜解体後の糞便汚染が関