

畜産食品の安全性確保に関する研究

分担研究報告書

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

分担研究者	荻原 博和	日本大学生物資源科学部
分担研究者	岡田 由美子	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	鈴木 穂高	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	吉田 麻利江	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	阿部 申	日本大学生物資源科学部
研究協力者	道下 正貴	日本獣医生命科学大学 獣医学部 講師
研究協力者	畠山 仁	日本獣医生命科学大学 獣医学部 助教

研究要旨：牛肝臓中の食中毒菌に対し、加熱によらない殺菌処理を行う目的で、静水圧を利用した高圧処理を実施し、牛肝臓に接種した大腸菌の不活化効果を検討した。その結果、菌懸濁液を用いた試験では、400MPa、10 分の処理で 5D の低減効果が得られた。大腸菌を接種した肝臓を用いた試験では、500MPa、10 分処理で 5D の低減効果が得られ、有効な不活化効果が認められた。しかしながら、肝臓の色彩と硬度に大きな変化がみられたため、条件の再検討を実施した。比較的低い圧力 250MPa に注目し処理時間を延長することで、低圧力で肝臓中の病原菌を不活化させる効果について検討を行ったところ、250MPa、180 分の処理で牛肝臓の変色、硬化が比較的抑制された。一方、菌数低減は 2D にとどまった。硬化の原因の探求を目的として実施した組織学的検討の結果、高圧処理をした肝臓では肝細胞の索状配列や小葉構造などにはほとんど変化が見られなかったものの、肝細胞の細胞質染色性が全体的に低下し、細胞質内に好酸性の小顆粒が見られる、血管内に好酸性の顆粒状構造物が認められるなどの変化が観察された。更に超微細形態学的変化について検討したところ、高圧処理を行った牛肝臓においては、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。このような肝細胞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。

また、鶏肉の生食及び不十分な加熱状態での喫食による健康被害がしばしば起こっているため、高圧処理を用いた鶏ササミ中の食中毒原因菌の低減についても検討した。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サルモネラが 2～5log の低減を示し、カンピロバクターでは 7log 以上が低減し、定量法では検出限界以下となった。今回の処理条件においては、肉色は白化及び硬化する傾向を示した。組織学的解析では、高圧処理を行っていない鶏ササミでは筋線維が密に存在しているのに対し、1 回でも高圧処理をかけた鶏ササミでは、筋線維の分布が疎となっており、筋線維のそれぞれが若干縮小していた。サルモネラにおいて、高圧処理後の発育集落数は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、高圧処理により損傷菌が発生していると思われた。以上の結果から、高圧処理により畜産食品中の食中毒菌の菌数低減が可能であり、特にカンピロバクターに高い効果を示した。

今後、十分な菌数低減効果を持ちつつ、肉質の変化を最小限にとどめうる条件の検討が必要と思われた。

A. 研究目的

食品や食材の殺菌には一般に加熱処理が行われており、食品の安全性向上に貢献している。一方で食材は加熱処理により、その性状や外観が変性することが知られている。これに対して加熱処理を伴わない、非加熱処理については化学的処理と物理的処理技術があり、代表的な技術として放射線照射、高電圧パルス、パルス光、高圧処理等が知られている。そのなかでも静水圧を利用した高圧処理は、1980年代に日本において林氏が約100 MPa以上の圧力を食品加工に利用する事を提唱して以来、高圧におけるさまざまな研究や高圧処理食品が開発されるようになった。高圧加工は加熱処理を施さないために、加熱による変性が少なく、果物等においては比較的生の食材の香り、色、風味が保たれた状態での食品製造が可能である。また、高圧処理により微生物が死滅するので、高圧力による食品汚染微生物の低減も可能である。

生の肝臓は病原菌に汚染している可能性が高いことから、生食するためにはこれらの病原菌、特に腸管出血性大腸菌の殺菌処理が必要となってくる。そのため生の食感をできるだけ残しつつ、これらの病原菌の殺菌を行い、病原菌による感染リスクの低減を図る必要がある。本研究では、非加熱殺菌処理の一つとして高圧処理による肝臓中の *E. coli* の不活化効果の検討を行った。初年度及び昨年の本研究では、牛肝臓に添加した大腸菌の高圧処理による不活化の検討を行った。初年度の検討では400MPa及び500MPaの処理により5logの低減が可能であった。一方で、肝臓の肉色及び肉質変化が著しいことが明らかとなった。次年度は、1250MPa180分の処理による肝臓中の *E. coli* への不活化効果と、肝臓の肉色及び肉質に及ぼす影響について検討を行ったところ、肝臓の変化は抑えられたものの、菌数の低減は2logにとどまった。

また、日本国内では鶏肉の生食及び不十分な加熱状態での喫食による健康被害がしばしば起こっている。市販鶏肉におけるカンピロバクターの汚染率は2008年の調査で41.8%、サルモネラは46.7%と高率であり、現在食中毒事件数で1、2位を占めるカンピロバクター食中毒と、サルモネラ食中毒の発生を減らすには、それらの原因食品となることが多い鶏肉の汚染低減が重要である。しかしながらこれらの細菌は、鶏肉の表面のみならず内部にも存在していることが知られており、食鳥処理における衛生管理の向上のみでは、汚染率の低減は困難と思われる。また、一部国民の生食嗜好により、鶏肉やその内臓肉を刺身やたたきとして生食または部分的な加熱のみで喫食することによる食中毒事例も多発しており、鶏肉の喫食、特に生食による食中毒発生を減少させるためには、これらの病原菌に対し加熱によらない殺菌を行い、感染リスクの低減を図る必要がある。本研究では、300MPa5分を6回反復する高圧処理条件による、鶏ササミ肉に人工的に接種したサルモネラ及びカンピロバクターへの菌数低減効果について検討した。

B. 研究方法

(1) 供試菌株

牛肝臓への接種試験には、*Escherichia coli* ATCC25922を用いた。培養菌液に対する高圧処理実験には、*S. Typhimurium*、*Salmonella* Enteritidis、*Pseudomonas aeruginosa*、*Cronobacter sakazakii*、*Providencia alcalifaciens*、*Yersinia enterocolitica*の計7菌株を用いた。鶏ササミへの接種試験には、*Salmonella* Typhimurium LT2株と*Campylobacter jejuni* NCTC 11168株を用いた。

(2) 検体

高圧処理を行う牛の肝臓は株式会社芝浦臓器より購入した。2代継代した *E. coli* 10^8 CFU/mL の菌液を使用した。牛の肝臓を横 2cm × 縦 3cm、厚さ 0.5cm 程度・重量 10g の長方形にカットされたブロックに、*E. coli* の菌液を等間隔 10カ所に合計 100 μ l を接種した。接種した肝臓はプラスチックバックに入れてシールを行い、さらに同様に包装して、二重の密封状態にして高圧処理用の試料を作製した。

培養菌液に対する高圧処理の検討は、培養した菌液をリン酸緩衝液に懸濁し、 10^8 CFU/mL となるように調整してアンプルに充填したものをを用いた。

鶏ささみ肉検体は市販のものをを用いた。接種試験用の検体は 10g 片に切断し、滅菌した高圧処理用袋に分包後、調整菌液を接種した。バキュームシーラーを用いて袋をシールしたのち、滅菌蒸留水を入れた外袋内で更にシールして密封した。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、1本のササミを滅菌済み高圧処理用袋に入れて密封したのち、滅菌蒸留水と共に外袋に密封した。

(3) 高圧処理

牛肝臓及び培養菌液に対する高圧処理試験には、HPV-80C20-S(スギノマシン)を用いた。高圧処理条件は、平成 25 年度には 200、300、400 及び 500MPa の圧力で、それぞれ 10、20 及び 30 分間、平成 26 年度には 250 MPa の圧力で、60 分、120 分、180 分間とした。

鶏ササミに対する高圧処理試験には TSP6-50 (東洋高圧)を用い、300MPa、5 分を 6 回反復する条件で行った。

(4) 菌数測定

牛肝臓に対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を 9 倍量の希釈水中で 10 倍乳剤を作成し、非選択培地である生菌数用の PCA 培地

を用いて混釈し、37 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(日水製薬社製)を用いて混釈し、37 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。

培養菌液に対する高圧処理の検討は、高圧処理後、アンプルから試料懸濁液を取り出し、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 或いは各菌の指摘温度で 24 時間培養し、発育した集落を計測した。

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ッカー処理して 5 倍乳剤を作成し、各 100 μ L を BHI 寒天平板及び CHROMagar サルモネラ平板に塗布後、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、CHROMagar サルモネラ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。

(5) 硬度及び色調

高圧処理後の肝臓肉色の変化を色差計(ミノ

ルタ)で測定した。肉質の硬さはレオメーターCR-3000EX(サン科学)を用いて測定した。

高圧処理による鶏ササミ肉の硬度及び色調の変化は、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) 病理組織学的検索

100~500MPaで処理した肝臓検体及び300MPaで処理した鶏ササミ検体を10%緩衝ホルマリン液で37℃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、光学顕微鏡を用いて観察した。

牛肝臓については、同条件での高圧処理後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超微細形態の観察を行った。

C. 結果

(1) *E. coli* の高圧処理による不活化効果

リン酸緩衝液に懸濁した*E. coli*の高圧処理における結果を平成25年度分担報告書Fig.1に示した。高圧処理前の未処理での菌数は対数値で9 log CFU/mlであった。これらの菌液の高圧処理を行うと、高圧処理200MPa・10分処理では未処理とほぼ同様の菌数を示し、高圧処理による菌数の減少は認められなかった。さらに高圧処理の時間を延長した20分処理では、死滅する現象が観察され、30分処理で1オ・ダの減少が認められた。次に高圧処理300MPaでは、200MPaに比べて急激な菌数の減少が観察され、10分処理で4.4 log CFU/ml、20分処理で3.3 log CFU/ml、30分処理で2.9 log CFU/mlに減少した。さらに高圧処理400MPaでは10分処理で3.0 log

CFU/ml、20分処理で2.6 log CFU/ml、30分処理で2.9 log CFU/mlに減少した。最も圧力の高い500MPaでは、10分処理で1.9 log CFU/ml、20分処理と30分処理では検出限界以下であった。

以上の結果、高圧処理により5 log CFU/mlの有効な低減効果が認められた圧力は400MPaと500MPaであった。さらに高圧処理時間を延長するにつれて、緩やかではあるものの殺菌効果が高まる傾向が認められた。

(2) 高圧処理による肝臓中の*E. coli*の不活化効果とその外観に及ぼす影響

牛肝臓に接種した*E. coli*の高圧処理による不活化効果を非選択培地のPCA培地を用いて生残菌数の結果を平成25年度分担報告書Fig.2に示した。予備実験により高圧処理が*E. coli*に対して有効な死滅効果が認められたことから、牛の肝臓に*E. coli*を接種して高圧処理条件を200MPa、300MPa、400MPa、500MPaそして処理時間10分で行った。その結果、肝臓中の未処理菌数は7.1 log CFU/gを示した。200MPa処理ではほとんど菌数の減少が観察されなかった。300MPaから菌数の減少が観察され1.5 log CFU/gの減少が認められた。さらに400MPaでは3.0 log CFU/gの減少、最も高い圧力の500MPaでは5 log CFU/gの菌数減少が認められ、5D程度の殺菌効果が得られた。実際に有効な5D程度の殺菌効果が認められた圧力は500MPaのみであった。

次に、同様に処理した試料を大腸菌の選択培地であるXMG培地を用いて検出測定した結果を平成25年度分担報告書Fig.3に示した。未処理の接種菌数はやや非選択培地より少ない6.8 log CFU/gであった。高圧処理200MPaでは菌数の減少は認められなかった。300MPa以上の圧力から菌数の減少が観察され、300MPaでは1.8 log CFU/gの減少が認められ、400MPaでは3.1 log CFU/g減少した結果となった。さらに

500MPa では 5.0 log CFU/g と有効な菌数の減少が認められ、5D 程度の殺菌効果が得られた。検出培地である非選択培地の PCA 培地と選択培地の XMG 培地間には顕著な差は観察されなかった。

以上のことから、非選択培地と選択培地による検出結果には、両者の測定法に差がないことから、選択培地に使用される選択剤による損傷菌による影響は少ないものと推察された。

高圧処理による肝臓色の变化を測定した結果を平成 25 年度分担報告書 Table1 に示した。肝臓の外観は圧力が高まるにつれて肝臓の色彩は、赤みが減少し肌色に変化する傾向が認められた。色彩色差計では、未処理の肝臓数値は L 値が 36.7 ± 1.3 、a 値が 6.5 ± 0.6 、b 値が 2.2 ± 0.3 を示した。圧力が高くなるにつれて、L 値は 200MPa より数値が増加し、300MPa で 44.3 ± 1.1 、500MPa で 50.4 ± 0.4 に増加した。a 値では 300MPa に 10.1 ± 1.0 に数値の増加が認められたものの 400MPa と 500MPa では顕著な変化は認められなかった。さらに b 値では 300MPa まで大きな数値の変動は見られなかったものの、500MPa では 8.0 ± 0.6 にまで増加した。

次に高圧処理における肝臓の色と硬さの変化を平成 25 年度分担報告書 Table 2 と Fig.4 に示した。肉色は処理前では鮮明な赤褐色を示したものの、高圧処理 200MPa では赤みが少なくなるものの肝臓色を維持していたが、300MPa 以降、400MPa と 500MPa と圧力が高くなるにつれて、赤みが退色し、白っぽくなり加熱したような色合いとなった。硬さについては、300MPa 以上で、当初の肝臓の柔らかさではなく、明らかに硬さが認められ、400MPa と 500MPa では弾力も感じられるようになった。特に未処理の肝臓とは肉質がかなり異なっていた。

以上の結果から、*E.coli* に対する効果は

500MPa・10min 処理で、5D の殺菌効果が得られ、有効な不活化効果が認められた。しかし、肝臓の状態は生の状態の色彩とテクスチャーは失われ、別物の感触となった。

(3) 高圧処理の圧力と時間が *E.coli* と *S. Typhimurium* に及ぼす死滅効果

リン酸緩衝液に懸濁した *E.coli* と *S. Typhimurium* における高圧処理 150MPa、200MPa、250MPa と処理圧力時間 60 分、120 分、180 分の結果を平成 26 年度分担報告書 Fig. 1 及び Fig. 2 に示した。

高圧処理前のアンプル中の *E.coli* 未処理の菌数は 9 log CFU/mL であった。これらの菌液を 150MPa の高圧処理を行ったところ、60 分、120 分、180 分と処理時間が長くなるにつれて菌数が減少する傾向が見られるものの、有効な死滅効果は認められなかった。次に 200MPa では 60 分処理で 7 log CFU/mL、120 分処理で 6 log CFU/mL、180 分処理で 5 log CFU/mL と直線的に菌数が減少する傾向が認められた。250MPa では 60 分処理では、9 log CFU/mL から 6 log CFU/mL と約 3D の死滅効果が得られ、120 分処理では 5 log CFU/mL、180 分処理では 3 log CFU/mL となり、約 5D の有効な殺菌効果が認められた。

さらに *S. Typhimurium* でも同様に実験を行ったところ、未処理の菌数が 9 log CFU/mL のものが、150MPa では 180 分処理で 7 log CFU/mL に減少した。200MPa では 60 分処理で 8 log CFU/mL に、180 分処理では 6 log CFU/mL に減少し、3D の死滅が認められた。250MPa では 150 や 200MPa に比べて菌数の減少効果は高く、60 分処理では 6 log CFU/mL に、120 分処理では 4 log CFU/mL、180 分処理では 3 log CFU/mL にまで減少した。*S. Typhimurium* は *E. coli* よりも高圧による影響を強く受ける傾向が認められ、*E. coli* と *S. Typhimurium* はいずれも約 5D の有

効な殺菌効果が認められた。

以上の結果、低圧の 250MPa でも高圧処理の時間を数十分の単位から時間の単位に延長することにより、高圧の 400MPa と同等の殺菌効果が得られることが確認された。さらに、処理時間の延長は緩やかな殺菌効果であるものの、有効な殺菌効果を得ることが可能であると推察された。

(4) 高圧処理における食品媒介病原細菌の死滅効果の検討

他の食品媒介病原細菌に対する 250MPa で 180 分処理を行った結果を平成 26 年度分担報告書 Fig. 3 に示した。

各食品媒介病原細菌の未処理での菌数は、約 8~9 log CFU/mL であった。これらの菌液をアンプルに封入して 250MPa で 180 分処理を行った結果、生残菌数は *S. Typhimurium*、*P. aeruginosa* と *E.coli* では 3 log CFU/mL となり、未処理の菌数と比較して 5 オ - ダ - の殺菌効果が認められた。さらに *C. sakazakii* では 2 log CFU/mL、*Y. enterocolitica*、*P. alcalifaciens*、*S. Enteritidis* の 3 菌種では 2 log CFU/mL 以下の数値で検出され、高圧に対する感受性が高い結果であった。

以上の結果、食品媒介病原細菌 6 菌種について 250MPa で 60 分処理を検討したところ、5 D の有効な殺菌効果が認められ、*E.coli* のみではなくグラム陰性の病原菌にも有効であることが明らかとなった。

(5) 牛肝臓に接種した *E.coli* の高圧による死滅効果の検討

予備実験により高圧処理が *E. coli* に対して有効な死滅効果が認められたことから、次に牛肝臓に *E. coli* を接種し、高圧処理 250MPa、60 分、120 分、180 分処理による肝臓中の *E. coli* の不活化を検討した結果を平成 26 年度分担報告書

Fig. 4 に示した。

高圧未処理の肝臓からは生菌数及び *E. coli* 数は 7 log CFU/g を示した。これらを 250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行ったところ、60 分処理では生菌数及び *E. coli* 数は 1 D の減少、さらに 120 分処理では 2 D の減少が認められた。さらに 180 分では生菌数で 3 D、*E. coli* で 2 D の死滅が認められた。これらの結果はリン酸緩衝液に懸濁して処理した結果より殺菌効果が劣る結果であった。今後は他の菌株や条件により異なることも考えられることからより詳細な検討並びにデ - タの構築が必要と考えられた。肝臓には高圧処理に対して保護効果や保護物質の存在の影響がある可能性も考えられた。

(6) 肝臓の色調と硬さに及ぼす高圧処理と処理時間の影響

高圧処理 250MPa で 60 分、120 分、180 分処理による肝臓の肉色の変化を色彩色差計で測定した結果を平成 26 年度分担報告書 Table 1 に、写真を平成 26 年度分担報告書 Fig. 5 に示した。未処理の肝臓の肉色は L 値が 34.14 ± 0.93 、a 値が 9.50 ± 0.23 、b 値が 4.43 ± 0.50 であった。250MPa の圧力処理を行うと 60 分処理で L 値が 41.74 ± 0.48 、a 値が 16.17 ± 0.51 、b 値が 7.04 ± 0.79 となり、高圧処理では L 値である明度が明るくなる傾向が認められ、さらに a 値の赤みはより赤くなる傾向が観察された。120 分処理では L 値が 43.33 ± 1.17 、a 値が 15.71 ± 0.93 、b 値が 7.18 ± 1.26 となった。さらに 180 分処理では L 値が 45.68 ± 0.95 、a 値が 14.29 ± 0.38 、b 値が 7.21 ± 0.62 となり、圧力処理時間の延長とともに肝臓の色彩は、明るい色を示し、高圧処理を行うと赤みが増加するが、処理時間が長くなるにつれて僅かであるが減少する傾向が認められた。

次に高圧処理における肝臓の硬さの変化を平成 26 年度分担報告書 Table 2 に、平成 26 年度

分担報告書写真を Fig. 6 に示した。肝臓の肉質は柔らかい傾向があるが、高圧処理を行うと硬さが増加することが前回の実験で判明している。そこで、今回はレオメーターを用いて肝臓の硬さについて検討を行った。肝臓の硬さは、硬度の数値で示した。未処理の状態では $0.0152 \pm 0.0068 \text{ kgf/mm}^2$ を示し、250MPa では60分処理を行うと $0.0246 \pm 0.0046 \text{ kgf/mm}^2$ 、120分処理では $0.0249 \pm 0.0048 \text{ kgf/mm}^2$ 、120分処理では $0.0343 \pm 0.0088 \text{ kgf/mm}^2$ の数値が得られた。肉の硬度は250MPaの圧力では時間の経過とともに数値は高区なる傾向を示した。しかし、触感では明らかに硬いと思われる感触ではなかった。

平成26年度分担報告書 Table 3 に高圧処理による肝臓の目視及び触感の結果を示した。未処理と高圧処理との間には明らかな相違が観察されたものの、高圧後は肝臓の肉色は未処理のものより赤みがかかった色彩を示した。しかし、処理時間に関しては感覚的に色合いや硬さについては処理を行うことによって顕著な差は感じられなかった。

(7) 高圧処理による牛肝臓の形態学的変化

高圧処理後の牛肝臓の外見写真を平成25年分担報告書 Fig.1 に、剖面写真を Fig.2 に示す。高圧処理により、牛肝臓検体の体積は外見的にはほとんど変化がなかった。肝臓の色は高い圧で処理した検体ほど、暗赤褐色から淡褐色へと退色が顕著であった。牛肝臓の剖面を作る際にナイフで切った際の感触では、より高圧で処理した検体ほど弾力が強く、硬くなっている傾向が認められた。Fig.2の剖面写真においても、高圧で処理した検体の断片ほど、断片が崩れることなく、硬くなっている様子が示されている。また、0MPaでは暗赤褐色で一様な断面を示しているが、200MPaではやや色合いが薄くなり、300、400、500MPaでは断面が淡赤褐色～淡褐色の斑状を呈していた。

形態学的には、高圧処理をした肝臓においても、肝細胞の索状配列や小葉構造などに形態的な変化はほとんど認められなかった(平成25年分担報告書 Fig.3)。しかし、強拡大像では、肝細胞の細胞質内に好酸性の小顆粒が認められるようになる一方、肝細胞細胞質の染色性は全体的に低下しており、また、血管内に好酸性の顆粒状構造物が認められるなどの変化が観察された(平成25年分担報告書 Fig.4)。

(8) 高圧処理による牛肝臓の超微細形態学的変化

高圧処理後の牛肝臓の電子顕微鏡写真を平成27年度分担報告書 Fig.1~3 に示す。高圧処理を行った牛肝臓では、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(Fig.1)、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(Fig.2)。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(Fig.3)。

(9) 高圧処理による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行った結果の菌数を平成27年度分担報告書図1及び2に示した。高圧処理は3回実施し、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 $1.04 \times 10^8 \text{ CFU/g}$ 及び約 $7.2 \times 10^7 \text{ CFU/g}$ 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 $8.5 \times 10^2 \text{ CFU/g}$ 、2回目が $1.05 \times 10^6 \text{ CFU/g}$ 、3回目が $9 \times 10^2 \text{ CFU/g}$ であった(平成27年度分担報告書図1)。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上の集落数よりも多く、

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回の処理全てにおいて、菌が検出されず、検出限界以下となった(平成27年度分担報告書図2)。但し、データは示していないが、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。

(10)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結果を表1及び2に、写真を図3に示した。未処理の鶏ササミの肉色は、明るさを示すL値が14.5、赤みを示すa値が2.3、黄色みを示すb値が6.3であった。300MPaの高圧処理の反復を行うと、1回の処理でL値が22.8となり、3回及び6回の処理においても1回目を超える値を示し、高圧処理の反復により、色調の明るさが増す結果となった(平成27年度分担報告書表1)。一方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。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、未処理のササミでは7.54065Nであったものが、1回の高圧処理により9.29252N、3回の処理で8.57844Nとなり、6回の処理後には12.55822Nの値を示し、実際の触感と高い相関を示していた(平成27年度分担報告書表2)。

300MPa、5分の高圧処理による鶏ササミの組織学的変化を平成27年度分担報告書図4、5に示した。高圧処理を行っていない鶏ササミでは筋線維が密に存在しているのに対し、1回でも高圧処理をかけた鶏ササミでは、筋線維の分

布が疎となっていた(平成27年度分担報告書図4)。筋線維のそれぞれが若干縮小しており、筋線維間には好酸性の微細な線維状物質が認められた(平成27年度分担報告書図5)。

D. 考察

400及び500MPaの高圧処理により、肝臓中の*E. coli*に対する不活化効果は認められるものの、その品質がかなり変性することが観察された。これらの処理を行った牛肝臓では、色が白っぽくなり、硬くなるなどの明らかな変化が認められた。しかし、組織形態学的にはそのような変化と一致するような著しい変化は観察されなかった。外見的な肝臓の色の変化は、肝細胞細胞質の染色性の低下と関連している可能性が考えられる。しかし、肝細胞の索状配列や肝臓の小葉構造などにほとんど変化はなく、また、肝細胞の大きさにもほとんど違いが認められないことから、少なくとも、高圧処理により肝臓が硬くなることに関して、形態学的変化と関連付けて説明することはできなかった。

300MPa以上の高圧処理検体で認められた肝細胞の細胞質内の好酸性小顆粒や血管内の好酸性顆粒状構造物については、光学顕微鏡レベルでの観察では不十分であり、より詳しく調べるためには電子顕微鏡を用いた微細形態学的検討をじっしした。その結果、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。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と考えられた。

150~250MPa の比較的低い圧力での *E. coli* の不活化の検討を行った結果、150MPa では有効な殺菌効果は見られなかったが、200MPa から殺菌効果が認められ、特に今回検討した250MPa は処理時間の経過とともに殺菌効果が高まる傾向が認められた。250MPa で180min では食品媒介病原細菌の低減化に有効な結果が得られ、*P. aeruginosa*、*E. coli*、*S. Typhimurium* では5Dの死滅効果がみられ、さらに*S. Enteritidis*、*P. alcalifaciens*、*C. sakazakii*、*Y. enterocolitica* では6D以上の殺菌効果が得られた。このような結果から、実際の肝臓に*E. coli* を接種して高圧処理(250MPaで180min)を行った結果では、2D程度の死滅効果しか得られなかった。緩衝液に懸濁した殺菌効果と肝臓に接種した実験結果ではかなり異なる結果となり、さらに処理条件である圧力と処理時間の検討が必要であると思われる。一方、肝臓の物理的な肉質に関連して150~250MPaで60分、120分、180分処理を肝臓に施したところ、肉色については150MPaから200MPa、200MPaから250MPaと高い圧力になるほど明るい色調を示した。500MPaの高い圧力に比べて色調の変化は少なく、良い肝臓の色調を維持し、やや赤みがかかった色合いであった。肝臓の硬さについては、250MPa処理を行うと硬さの数值は高くなる傾向が見られるものの、未処理のものに比較してやや硬くなる傾向が認められているが、未処理の肝臓と比較しない限り明瞭な違いは見られなかった。

高圧処理は肝臓中の腸管出血性大腸菌のリスク低減には有効と考えられるが、これらの高圧条件に更なる有効な殺菌方法を組み合わせた処理法の検討が必要であると考えられた。一方、未処理肝臓としての食味と食感は異なることとなり、生レバーとしての価値が見いだせるものか不明瞭で検討の必要があると考えられる。肝臓の物理的な変化は従来の400MPa~500MPaの圧力と異なり、比較的穏和な処理の

ため肝臓の色合いや柔らかさは残存し有効であると考えられた。最終的には専門的な官能検査も必要となると考えられた。

以上のことから、250MPaで180分処理の高圧処理は、肝臓のそのものは顕著な肉色や肉質の変化は認められなかったものの、やや*E. coli* に対する不活化効果は十分ではない結果となった。今後は加圧処理時間の延長やさらなる不活化データの構築も必要と考えられた。最終的には実際に腸管出血性大腸菌を用いた殺菌効果の検討や製造工程においても一貫した衛生管理システムの導入が必要であると考えられた。

鶏ササミ中のサルモネラ及びカンピロバクターの、高圧処理による不活化を検討した。過去の論文において、高圧条件を300MPaに設定し、5分間の処理を6回反復させることにより、同じ圧力で30分連続の処理を行うよりも高い殺菌効果が得られるとされており、同様の条件での検討を実施した。その結果、カンピロバクターに対しては7log削減という高い菌数低減効果を示した。また、3回の試験におけるばらつきも見られなかった。増菌培養により菌が検出されたため、完全な除菌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削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より多くの菌が蘇生する可能性があると思われる。これらの結果から、本菌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く、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質となっていた。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。

E. 結論

非加熱殺菌処理方法の一つである高圧処理による肝臓中の *E. coli* の不活化効果の検討を行った結果、500MPa、10 分の処理で、5D の殺菌効果が認められた。しかしながら、高圧処理により肝臓の赤みが退色し、白っぽくなり加熱したような色調変化と、著しい硬化がみられ、品質が大きく変化していた。品質変化を防ぎ、十分な殺菌効果を示す条件の検討が必要であることが示された。

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ところ、高圧処理により生じる牛肝臓の色、ならびに硬さの著しい変化に対応するような、顕著な形態学的所見は得られなかった。組織構造に大きな変化は認められなかったが、細胞レベルでの微細な変化は認められた。電子顕微鏡を用いた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。

高圧処理の 250MPa、180 分処理は、希釈液中の食品媒介病原細菌の菌数低減には有効であった。牛肝臓に対する影響は、色いや硬さの面でやや赤みや硬さの変化が認められるものの一定の評価が得られた。しかしながら、低減菌数は 2log にとどまった。

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 7log、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る。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

