

平成 27 年度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）

「野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究」

分担研究報告書

鹿・猪肉の加工・販売・調理段階における衛生実態に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究分担者	杉山 広	国立感染症研究所 寄生動物部
協力研究者	高橋和志	北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課
協力研究者	水田 勲	千葉県健康福祉部衛生指導課
協力研究者	坂倉佳佑	千葉県健康福祉部衛生指導課
協力研究者	水野浩子	愛知県健康福祉部保健医療局生活衛生課
協力研究者	森 篤志	日本冷凍食品検査協会横浜センター
協力研究者	安河内彩	日本冷凍食品検査協会関西事業所
協力研究者	梶田和彌	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
協力研究者	倉園久生	国立大学法人帯広畜産大学 畜産学部
協力研究者	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨：平成 26 年 11 月に野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドラインが策定され、HACCP 導入に向けた国内の食品産業の流れに則り、当該獣肉（特に鹿肉及び猪肉）の衛生管理実態の更なる把握と汚染制御対策の充実が求められている。本分担研究では、計 3 自治体の協力を得て、各管轄下にある鹿肉または猪肉の加工・販売・流通施設での衛生管理実態の把握のため、調査協力を求めた、各過程での衛生管理実態を調査した。A 自治体下では、鹿肉の加工・販売・調理施設を視察した。加工過程では、電解水を用いて枝肉表面を洗浄後、ブロック肉へ整形し、金属探知機→脱気密封→急速液体冷凍→出荷の流れをとっており、加工施設での拭き取り検体は何れも大腸菌群陰性を示した。同加工肉の販売施設で、他加工施設より出荷された鹿肉と共に、衛生指標菌の定量評価を行ったが、先述の鹿肉製品は、他加工施設由来製品に比べ、約 1 オーダー低い生菌数を示した。また、同鹿肉製品を常用する調理施設厨房において、拭取り調査を行ったが、何れの箇所も大腸菌群陰性となり、加工以前の衛生状態及び流通形態（温度帯、包装形態等）が調理段階に至る各工程での同食肉製品の衛生状況に大きく影響を及ぼすことが示唆された。B・C 自治体下の視察先では、猪肉を主に加工・販売・調理していたが、うち B 自治体下の加工・販売施設での拭取り調査では、スライサー及び猪スライス肉より大腸菌が検出され、一部の分離菌株は同一遺伝子型を示し、スライサーより食肉への交叉汚染が示唆された。同情報を B 自治体へフィードバック後、改めて猪スライス肉製品を試験に供したところ、何れも大腸菌陰性となり、製品の清浄化が確認された。C 自治体下の調理施設では加工を一切行わず、専用保管庫で冷凍保存した猪肉を解凍後、加熱調理（揚げる又は炒める）のみ行っている状況を確認した。同製品の加工施設での実証は来年度を予定している。

衛生管理実態の多様性が想定されたことから、計 23 の通信販売業を営む販売施設より、鹿肉 118 製品、猪肉 128 製品を入手し、同様の細菌試験に供した。鹿肉・猪肉検体間において生菌数では有意差を示さなかったが、大腸菌群陽性率は猪肉検体が 65.6%と、鹿肉の 26.3%に比べ高い値を示した。同様に、大腸菌についても、猪肉は 46.9%、鹿肉は 15.3%の陽性率を示し、前者が高い傾向を認めた。病原細菌としては、鹿肉 1 検体より志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) が検出されたが、猪肉検体は何れも陰性であった。サルモネラ属菌については、全ての供試検体が陰性を示した。また、鹿肉製品の一部は依然として生食用製品（鹿刺し等）として販売・流通されており、同製品の一部からは最大で 5.8×10^3 CFU/g の大腸菌が検出され、当該肉製品の生食を控える旨の更なる周知の必要性が示された。

A. 研究目的

平成26年11月に厚生労働省では、野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドラインを策定し、とちく場法に倣った解体処理およびその後の食肉加工・販売・調理に関する衛生的な取扱いを周知した。一方、同ガイドラインでは、解体から調理に至る過程での衛生的取扱い方法について、例示しておらず、その作成のための実態把握が求められている。本研究では、計3自治体下の加工・販売・調理施設を視察すると共に、施設拭き取り調査を行い、施設衛生実態の把握に努めると共に、市販される鹿肉および猪肉製品を対象とした衛生検査を行い、同食肉製品の危害性に関する知見の収集にあたったので、報告する。

B. 研究方法

1. 加工・販売・調理施設の視察および検体入手・輸送方法

1-1. 平成27年11月上旬に、A自治体管轄下にある、猪肉加工施設（販売施設も併設）を視察し、同施設の拭取り及び猪肉製品を入手した。また、同加工施設由来猪肉を取り扱う販売施設及び調理施設を別途訪問し、施設拭き取りを行った。何れの検体についても、採取翌日に当研究所宛に届くよう冷蔵配達した。個々の拭き取り箇所及び製品情報については表1に記した。

1-2. 平成27年11月下旬にB自治体管轄下にある、鹿肉加工施設1施設を視察すると共に、施設拭き取りを行った。また、当該施設で加工された鹿肉製品を取り扱う販売施設1か所および異なる加工施設由来鹿肉を販売する施設1か所をそれぞれ訪問し、検体を入手した。さらに、視察対

象とした加工施設より直接購入・調理に供している調理施設を訪問し、視察ならびに厨房施設での拭き取り調査を行った。何れの検体も採取後は速やかに冷蔵温度帯で、所属機関宛に翌日到着指定で配送した。個々の拭き取り箇所及び製品情報については表2に記した。

1-3. 平成27年10月にC自治体の管轄下にある、猪肉販売・調理施設を視察し、調理施設での管理状況に関する情報収集を行うと共に、製品を入手し、当日中に所属機関に持ち帰り、速やかに衛生試験に供した。

2. 検体の前処理及び指標菌定量試験

施設拭取り検体については、1分間ボルテックスにて攪拌を行い、試料原液とした後、滅菌生理食塩水を用いて、10倍段階希釈液を作成した。製品検体については、25gを無菌的に採取し、225mLの緩衝ペプトン水(BPW)の入ったストマッカー袋に入れ、ホモゲナイザーを用いて十分に混和させた後、10倍乳剤を調整した。これを原液として10倍段階希釈液を作成し、標準寒天培地、Violet Red Bile Lactose (VRBL) 寒天培地、TBX 寒天培地及びベアード・パーカー寒天培地に1mLずつ混釈法にて接種し、各培地の条件に従って培養を行い、発育集落数を算定した。また、確定試験については、ISO法に準拠して実施し、生菌数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。

3. 主要病原細菌の検出試験

上述の施設拭取り原液1mL残液を、9mLのBPWに加え、37℃にて20時間培養後、同培養液からのDNA抽出を行った。また、BPWを用いて調整した製品検体懸濁原液

については、残液全量を 37°Cにて 20 時間培養し、培養後溶液 1ml より DNA 抽出を行った。それぞれの培養後検体由来 DNA を鋳型として、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の産生する志賀毒素遺伝子である *stx*, サルモネラ属菌に共通して保有が認められるサルモネラエンテロトキシン遺伝子 *stn* を標的とした PCR 法を、定法に従って実施し、同 2 種の病原菌に対するスクリーニングを行った。

4. 病原細菌の分離培養と性状試験

スクリーニング試験により、STEC 陽性となった検体からの分離については、培養液をクロモアガーSTEC 寒天培地に塗抹し、発育した典型集落を釣菌し、*stx* 遺伝子を標的としたコロニーPCR 法に供することで、分離培養を行った。得られた菌株については、-80°Cにて保存した。

C. 研究結果

1. 加工・販売・調理施設における衛生実態に関する検討

1-1. A 自治体下の猪肉関連施設調査
視察先である猪肉加工・販売施設では、解体後の枝肉をチルド温度帯にて数日間保管後、スライスあるいはミンチ加工し、店頭・通信販売、販売業者への卸売、及び別棟の飲食施設へ供給していた。同飲食施設では、加工施設でスライス・ミンチした猪肉を加熱調理するのみで、保存は実施していなかった。

各施設における拭き取り調査成績は表 1 に記した。加工施設 (以下、施設 α) では、加工作業台 (使用・洗浄後)、まな板 (使用前)、スライサー刃部分 (使用后)、ミンチ肉を使った整形済コロッケ保管容器内壁を

対象に拭き取りを行った。スライサー刃を除いた拭き取り箇所が生菌数は概ね 10^2 - 10^3 CFU/100cm² であり、大腸菌群・大腸菌・黄色ブドウ球菌は何れも陰性を示したが、スライサー刃拭き取り検体 (N=2) における生菌数は約 10^5 - 10^6 CFU/100cm² と相対的に高く、うち 1 検体からは大腸菌群・大腸菌も検出された (表 1)。

施設 α で加工された猪肉製品については、平均生菌数は 8.9×10^4 CFU/g と豚肉等のそれと大きな差異は示さなかったが、全 8 検体全てより大腸菌が検出され、平均菌数は、32.3CFU/g であった。同検出情報をフィードバックした後、改めて同一製品を入手し、同様の試験に供したところ、平均生菌数は 2.8×10^4 CFU/g となり、大腸菌は何れも検出限界以下 (<10CFU/g) となった。

また、施設 α より出荷された製品を使った調理施設へも訪問したが、当該施設ではスライス加工及び真空パック包装を行った猪肉を専用の冷凍庫で保管していた。同庫から取り出した猪肉は、専用のまな板、包丁を使用して調理に供していた。まな板、包丁を拭き取り検査に供したところ、生菌数は 3.0 - 4.0×10^2 CFU/100cm² を示した他、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌は何れも検出限界以下 (< 10 CFU/ 100cm²) であった (表 1)。

1-2. B 自治体下の鹿肉関連施設調査

鹿肉加工・販売施設 (以下、施設 β) を視察し、施設拭き取り調査を行った。加工施設内のまな板及び刃を対象とした拭き取り調査結果として、全ての指標菌は検出限界以下となった (表 2)。当該施設では、二種

の異なる pH の電解水を加工工程前後に使用して十分な洗浄をしていた他、刀等も使用毎に熱湯消毒を行っている実態を確認した。加工作業は部位別にブロック肉とした後、金属探知器に通し、真空パックへ封入し、急速液体冷凍を行っていた。同冷凍処理の細菌汚染低減効果を確認するため、施設βより直接冷凍あるいはチルド保管・輸送した同一ロットの鹿モモ及びロース製品を入手し、指標菌定量試験に供したところ、モモ肉の生菌数は冷凍製品で 7.2×10^3 CFU/g、チルド製品では 8.9×10^3 CFU/g、ロース肉の生菌数は冷凍製品で 5.1×10^3 CFU/g、チルド製品では 5.9×10^3 CFU/g となり、大きな差異は見られないものの、若干冷凍製品で低い傾向を示した（表3）。

施設βより出荷された鹿肉を取扱う販売施設を視察し、製品の細菌汚染実態を調査した。同販売施設では、専用の冷蔵コーナーを設けており、他食肉との交叉汚染が生じないように、注意を払っていた。鹿肉製品の平均生菌数は、 2.6×10^4 CFU/g であり、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌は何れも検出限界以下であった（表3）。上述の施設βとは異なる施設（γ）で加工された鹿肉を取り扱う別の販売施設を視察し、製品の細菌汚染調査へ供したところ、生菌数は 5.8×10^5 CFU/g と、先の製品に比べ、1 オーダー以上高い値を示した（表3）。

次に、施設βより直接納品を受ける調理施設を視察し、厨房での拭き取り調査を行った。当該施設では、交叉汚染が極力生じないように肉や魚と、生野菜を隔てた調理台で使用していた他、使用したまな板や包丁は洗剤を用いて洗浄後、一晚、次亜塩素酸消毒を行っていた。拭き取り検査の結果と

して、冷凍鹿肉の自然解凍を行う冷蔵庫トレイ部分及び同内扉より $10\text{CFU}/100\text{cm}^2$ の黄色ブドウ球菌が検出された他、大腸菌群及び大腸菌は何れも検出限界以下であった（表4）。また、生菌数については全ての採材箇所でも 10^3 オーダー/100 cm^2 であった（表4）。

1-3. C 自治体下の猪肉販売調理施設調査

C 自治体下の販売・調理施設を視察し、猪肉製品（冷凍ブロック肉）を入手した。当該製品計8検体における生菌数平均値は 3.2×10^6 CFU/g であり、うち2検体では大腸菌群も陽性（陽性検体内平均値 = 1.5×10^2 CFU/g）であった（表5）。大腸菌群及び黄色ブドウ球菌は何れも検出限界以下であった（表5）。当該製品については、狩猟時からのトレースが可能なよう、ロット番号管理・表示を行っていた。

当該製品を用いて調理する施設では、A 自治体の調理施設と同様に、スライス・真空包装した製品を専用の冷凍庫内で保管管理しており、カット・スライス等の調理工程は行わないため（包丁の使用もなし）、拭き取り調査対象とはしなかった。同食肉のカット等については、別施設で実施していることが今回の視察及び聞き取り調査を通じて判明したので、来年度は当該加工施設への視察訪問ならびに施設環境調査を実施すべく、自治体担当者と調整を行っている。

2. 市販鹿肉・猪肉製品における細菌汚染実態

計16道府県に跨る通信販売業を営む鹿肉または猪肉販売施設（計23施設）より、

それぞれ 118 製品及び 128 製品を購入し、細菌試験（衛生指標菌定量試験及び病原細菌定性検出試験）に供した。

2-1. 指標菌分布

鹿肉・猪肉製品別の指標菌数分布については、図 1 及び表 6 に記した。生菌数平均値は、鹿肉・猪肉とも概ね 106CFU/g 程度であったが、大腸菌群陽性率は猪肉製品が 65.6%であったのに対し、鹿肉製品では 26.3%と低い値を示した。同様に、大腸菌陽性率についても、鹿肉製品では 15.3%であったのに対し、猪肉製品では 46.9%と後者が高い傾向を示した。大腸菌汚染菌数として最も高値を示した製品は、鹿肉・猪肉を含めて、 10^3 オーダー/g であり、製品は異なるものの何れも特定の販売業者（2 業者）由来検体であった。

STEC 及びサルモネラ属菌の検出試験の結果として、鹿ロースブロック肉 1 検体より STEC 陽性が確認された（表 6）。全ての猪肉検体は同病原体陰性であった。

D. 考察

本研究では、計 3 自治体下の加工・販売・調理施設への視察を行い、施設拭き取り調査と製品検査を通じ、汚染実態の把握を行うと共に、1 加工施設では汚染箇所の特定を行うことができた。更に、来年度の研究協力として、B 自治体下の調理施設においては加熱調理の検証について承諾を得た他、販売施設では自ら加工も行っており、同施設環境における調査協力についても承諾を得たので、これらの対応を行い、より詳細な情報の収集に努めたい。

また、本研究では、市販鹿肉・猪肉における細菌汚染実態に関する検討を行い、猪

肉製品では鹿肉製品のそれらと比べ、相対的に高い大腸菌（群）汚染を認める実態を明らかにした。しかしながら、STEC については、鹿肉からのみ検出されたことから、両食肉製品における健康危害性の順位等に関しては、更なる知見の収集が必要であると考えられる。

本研究において病原細菌の検出対象とした STEC とサルモネラ属菌については、Sasaki らの報告（Foodborne Pathog. Dis. 2013. 10(11): 985-91.）において、解体処理場で採材した猪及び鹿糞便からの両病原細菌の検出状況を根拠としている。同報告では、鹿糞便からは STEC が、猪糞便からはサルモネラ属菌が高頻度に検出されており、鹿肉製品から STEC が検出された本研究の成績は、これを支持するものであるといえよう。一方、猪肉からは、サルモネラ属菌は検出されなかったが、大腸菌汚染率については、鹿肉に比べ、高い傾向を示していたことを鑑みれば、猪肉の加工過程における糞便汚染は相対的に高い割合で生じているとも推察される。また、加工施設毎に、大腸菌汚染率は大きく異なっていたことから今後、高い大腸菌汚染率を示した加工・販売施設を対象とした製品および施設環境調査が必要と考えられる。

E. 結論

鹿肉及び猪肉の加工・販売・調理施設への視察を通じて、各施設での工程は多様であり、一部では大腸菌汚染も見いだされたが、改善のための情報フィードバック及び衛生指導を通じて、製品の陰性化を行うことができた。また、市販製品を対象とした指標菌及び STEC 汚染分布に関する知見の

収集を行ったが、各施設間で想定される工程管理の多様性から、当該施設では HACCP 導入型管理運営基準の運用が望ましいと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. A自治体下の猪肉加工・販売施設における拭き取り検査成績

採材工程	採材箇所	検体形状 ／分類	指標菌数(CFU/100cm ² 又はg)			
			生菌数	大腸菌群数	大腸菌数	黄ブ菌数
加工	作業台	拭き取り	6.00E+02	<10	<10	<10
加工	スライサー刃	拭き取り	4.33E+06	1.00E+03	1.00E+03	<10
加工	スライサー刃	拭き取り	7.08E+05	<10	<10	<10
加工	まな板	拭き取り	5.40E+03	<10	<10	<10
加工	まな板	拭き取り	2.62E+04	<10	<10	<10
加工	コロッケ整形器	拭き取り	5.00E+02	<10	<10	<10
加工	コロッケ整形器	拭き取り	3.00E+02	<10	<10	<10
販売	ショーケース	拭き取り	3.00E+02	<10	<10	<10
販売	ショーケース	拭き取り	3.00E+02	<10	<10	<10
販売	肩ロース	製品(1回目)	1.63E+05	1.00E+02	4.50E+01	<10
販売	肩ロース	製品(1回目)	1.80E+05	2.00E+02	4.00E+01	<10
販売	肩ロース	製品(1回目)	1.19E+05	2.00E+02	5.20E+01	<10
販売	肩ロース	製品(1回目)	4.00E+04	1.00E+02	3.50E+01	<10
販売	肩ロース	製品(1回目)	6.10E+04	9.00E+01	2.00E+01	<10
販売	肩ロース	製品(1回目)	8.80E+04	1.80E+02	1.00E+01	<10
販売	肩ロース	製品(1回目)	3.80E+04	1.60E+02	2.20E+01	<10
販売	肩ロース	製品(1回目)	1.95E+04	2.00E+02	1.20E+01	<10
販売	肩ロース	製品(2回目)	1.93E+04	<10	<10	<10
販売	肩ロース	製品(2回目)	1.47E+04	<10	<10	<10
販売	肩ロース	製品(2回目)	1.01E+04	<10	<10	<10
販売	肩ロース	製品(2回目)	1.97E+04	<10	<10	<10
販売	肩ロース	製品(2回目)	1.06E+05	2.00E+02	<10	<10
販売	肩ロース	製品(2回目)	2.09E+04	<10	<10	<10
販売	肩ロース	製品(2回目)	1.94E+04	<10	<10	<10
販売	肩ロース	製品(2回目)	1.12E+04	<10	<10	<10

表2. B自治体下の鹿肉加工施設における衛生試験成績

採材箇所	採材日	指標菌(CFU/100cm ²)			
		生菌数	大腸菌群数	大腸菌数	黄色ブドウ球菌数
まな板①	20151124	<10	<10	<10	<10
まな板②	20151124	<10	<10	<10	<10
刀①	20151124	<10	<10	<10	<10
刀②	20151124	<10	<10	<10	<10

表3. B自治体下の鹿肉販売施設における鹿肉製品の衛生試験成績

検体 番号	部位	販売形態	販売店での 加工の有無	解体・加工施設	指標菌数(CFU/g)				STEC	サルモネラ 属菌		
					生菌数	大腸菌群数	大腸菌数	黄色ブドウ球菌数				
1	ロース	冷蔵(解凍品)	有	施設γ	3.37E+05	<10	<10	<10	陰性	陰性		
2	ロース	冷蔵(解凍品)	有	施設γ	1.74E+06	<10	<10	<10				
3	ロース	冷蔵(解凍品)	有	施設γ	3.53E+05	<10	<10	<10				
4	ロース	冷蔵(解凍品)	有	施設γ	8.32E+05	<10	<10	<10				
5	ロース	冷蔵(解凍品)	有	施設γ	3.07E+05	<10	<10	<10				
6	ロース	冷蔵(解凍品)	有	施設γ	8.00E+05	<10	<10	<10				
7	肩ロース	冷蔵	有	施設γ	3.59E+05	<10	<10	<10				
8	肩ロース	冷蔵	有	施設γ	3.87E+05	<10	<10	<10				
9	肩ロース	冷蔵	有	施設γ	1.20E+05	<10	<10	<10				
10	肩ロース	冷蔵	有	施設γ	5.33E+05	<10	<10	<10				
施設γ 由来検体の平均値					5.77E+05	<10	<10	<10	陰性	陰性		
11	モモブロック	冷凍	無	施設β	3.16E+04	<10	<10	<10	陰性	陰性		
12	モモブロック	冷凍	無	施設β	1.70E+04	<10	<10	<10				
13	モモブロック	冷凍	無	施設β	3.25E+04	<10	<10	<10				
14	モモブロック	冷凍	無	施設β	1.54E+04	<10	<10	<10				
15	モモスライス	冷凍	無	施設β	3.14E+04	<10	<10	<10				
16	モモスライス	冷凍	無	施設β	1.44E+04	<10	<10	<10				
17	モモスライス	冷凍	無	施設β	3.14E+04	<10	<10	<10				
18	モモスライス	冷凍	無	施設β	1.51E+04	<10	<10	<10				
19	ミンチ	冷凍	無	施設β	3.72E+04	<10	<10	<10				
20	ミンチ	冷凍	無	施設β	1.40E+04	<10	<10	<10				
21	ミンチ	冷凍	無	施設β	2.95E+04	<10	<10	<10				
22	ミンチ	冷凍	無	施設β	1.27E+04	<10	<10	<10				
23	ミンチ	冷凍	無	施設β	3.42E+04	<10	<10	<10				
24	ミンチ	冷凍	無	施設β	1.36E+04	<10	<10	<10				
25	ミンチ	冷凍	無	施設β	2.91E+04	<10	<10	<10				
26	ミンチ	冷凍	無	施設β	7.07E+04	<10	<10	<10				
27	ミンチ	冷凍	無	施設β	3.14E+04	<10	<10	<10				
28	ミンチ	冷凍	無	施設β	1.56E+04	<10	<10	<10				
29	ミンチ	冷凍	無	施設β	3.46E+04	<10	<10	<10				
30	ミンチ	冷凍	無	施設β	1.56E+04	<10	<10	<10				
31	肩スライス	冷凍	無	施設β	2.93E+04	<10	<10	<10	陰性	陰性		
32	肩スライス	冷凍	無	施設β	1.54E+04	<10	<10	<10				
33	肩スライス	冷凍	無	施設β	2.89E+04	<10	<10	<10				
34	肩スライス	冷凍	無	施設β	1.41E+04	<10	<10	<10				
35	モモブロック	冷蔵	有	施設β	9.30E+03	<10	<10	<10				
36	モモブロック	冷蔵	有	施設β	1.37E+04	<10	<10	<10				
37	モモブロック	冷蔵	有	施設β	7.20E+03	<10	<10	<10				
38	モモブロック	冷蔵	有	施設β	5.50E+03	<10	<10	<10				
39	モモブロック	冷凍	有	施設β	7.20E+03	<10	<10	<10				
40	モモブロック	冷凍	有	施設β	6.50E+03	<10	<10	<10				
41	モモブロック	冷凍	有	施設β	8.40E+03	<10	<10	<10				
42	モモブロック	冷凍	有	施設β	6.70E+03	<10	<10	<10				
43	ロースブロック	冷蔵	有	施設β	4.70E+03	<10	<10	<10	陰性	陰性		
44	ロースブロック	冷蔵	有	施設β	6.40E+03	<10	<10	<10				
45	ロースブロック	冷蔵	有	施設β	6.00E+03	<10	<10	<10				
46	ロースブロック	冷蔵	有	施設β	6.30E+03	<10	<10	<10				
47	ロースブロック	冷凍	有	施設β	4.40E+03	<10	<10	<10				
48	ロースブロック	冷凍	有	施設β	5.10E+03	<10	<10	<10				
49	ロースブロック	冷凍	有	施設β	6.80E+03	<10	<10	<10				
50	ロースブロック	冷凍	有	施設β	4.20E+03	<10	<10	<10				
施設β 由来検体の平均値					1.81E+04	<10	<10	<10			陰性	陰性

表4. B自治体下の調理施設厨房における拭き取り調査成績

採材箇所	指標菌数(CFU/100cm ²)				STEC(定性)
	生菌数	大腸菌群数	大腸菌数	黄色ブドウ球菌	
①冷蔵庫トレー	6.30E+03	< 10	< 10	10	陰性
②加熱後包丁	6.00E+03	< 10	< 10	< 10	陰性
③肉エリア調理台	5.80E+03	< 10	< 10	< 10	陰性
④RTE調理台(野菜用)	5.10E+03	< 10	< 10	< 10	陰性
⑤流し台	5.60E+03	< 10	< 10	< 10	陰性
⑥冷蔵庫内扉	5.80E+03	< 10	< 10	10	陰性

表5. C自治体下の販売施設で入手した猪肉検体における衛生試験成績

検体番号	部位	生菌数	大腸菌群数	大腸菌数	黄色ブドウ球菌数	STEC	サルモネラ属菌
①	モモ	3.36E+05	2.00E+02	<10	<10	陰性	陰性
②	モモ	2.81E+05	<10	<10	<10	陰性	陰性
③	モモ	1.31E+06	1.00E+02	<10	<10	陰性	陰性
④	モモ	2.67E+05	<10	<10	<10	陰性	陰性
⑤	モモ	7.30E+06	<10	<10	<10	陰性	陰性
⑥	モモ	6.20E+06	<10	<10	<10	陰性	陰性
⑦	モモ	3.03E+06	<10	<10	<10	陰性	陰性
⑧	モモ	7.01E+06	<10	<10	<10	陰性	陰性

表6. 市販鹿肉・猪肉製品における指標菌及び病原細菌検出状況

種別		指標菌数(CFU/g)				病原細菌	
		生菌数	大腸菌群数	大腸菌数	黄色ブドウ球菌数	STEC	サルモネラ属菌
鹿肉	平均	1.13 × 10 ⁶	2.35 × 10 ³	1.39 × 10 ²	1.67 × 10 ¹	-	-
	標準偏差	4.92 × 10 ⁶	1.72 × 10 ⁴	9.00 × 10 ²	4.08 × 10 ¹	-	-
	陽性率	-	26.30%	15.30%	9.46%	0.85%	0%
猪肉	平均	1.01 × 10 ⁶	1.41 × 10 ³	1.75 × 10 ²	5.42 × 10 ⁰	-	-
	標準偏差	4.34 × 10 ⁶	6.72 × 10 ³	1.04 × 10 ³	2.29 × 10 ¹	-	-
	陽性率	-	65.60%	48.60%	15.80%	0%	0%

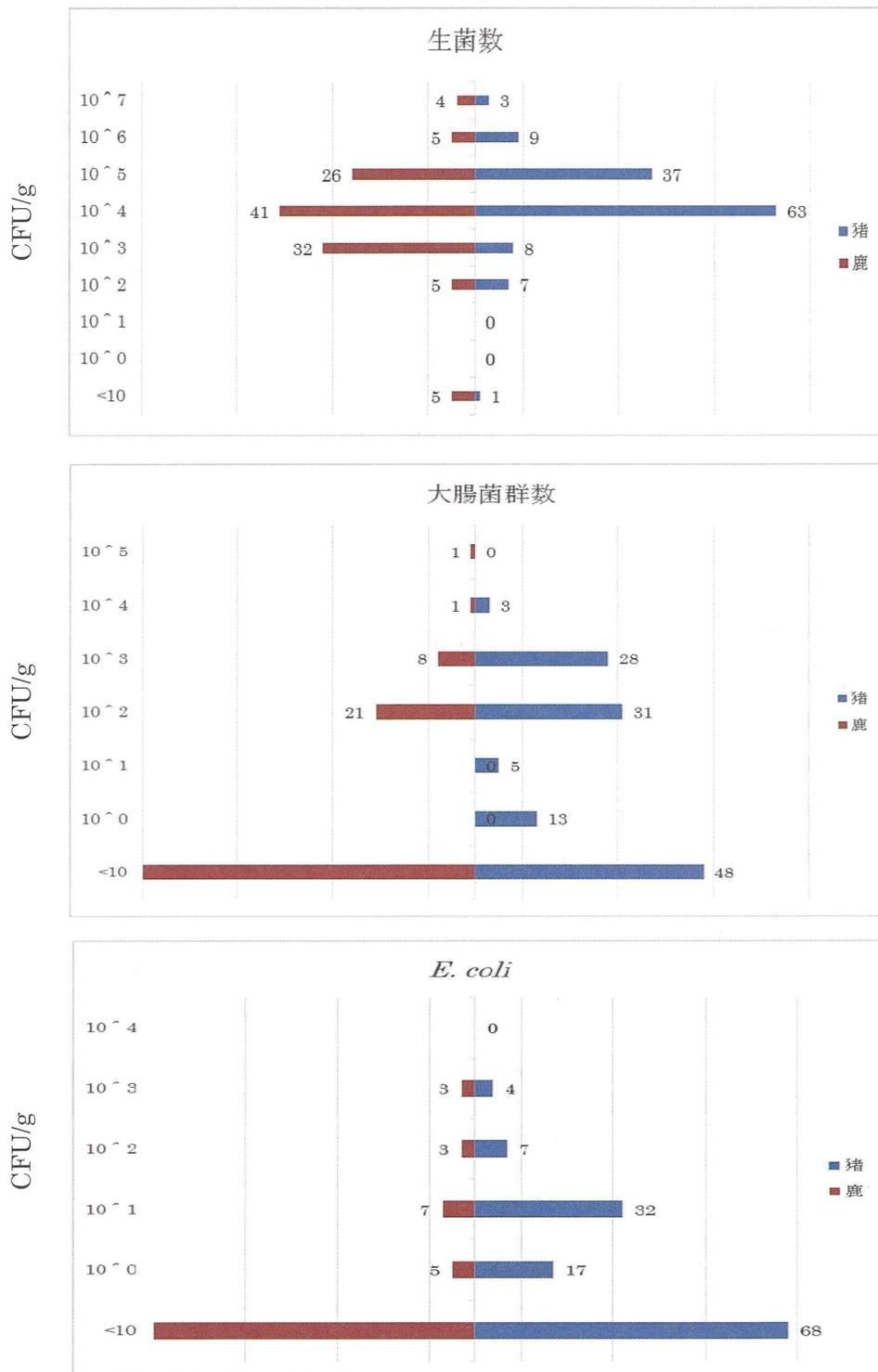


図1. 市販鹿肉・猪肉製品における指標菌汚染分布

鹿肉 118 検体、猪肉 128 検体における生菌数、大腸菌群数、大腸菌数を検体 1g あたりの菌数分布 (CFU/g) を示す。各指標菌の検出限界値は 10CFU/g であることから、<math><10</math> は不検出を意味する。

平成27年度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）

「野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究」

分担研究報告書

シカ肉に寄生するサルコシスティス属寄生虫の調理過程 における死滅条件に関する研究

研究協力者 小西 良子 麻布大学 生命・環境科学部

研究協力者 本田三緒子 ヤマザキ学園大学 動物看護学部

研究分担者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

我国では、一般消費者に対するアンケート調査結果（2012年）¹では、ジビエ料理のイメージとして、「高級感」「希少性」「美味しさ」等により約7割が野生鳥獣料理を食べてみたいと回答している。この背景には、食文化の多様化による肉食嗜好の高まり、食物アレルギー対策、環境保全と野生鳥獣の問題が挙げられる。

平成23年6月、住肉胞子虫 *Sarcocystis fayeri* が馬肉の食中毒原因物質として通知された。近年ジビエの一種である鹿肉に住肉胞子虫 *Sarcocystis* 属が高頻度で規制していることが報告されている。馬肉中の寄生虫は馬肉の中心温度を -20°C にした場合48時間以上、 -30°C にした場合36時間以上保持すれば死滅することが示されているが、鹿肉中の *Sarcocystis* 属に関しては、死滅を起こす物理的・化学的条件について全く分かっていない。

そこで、本研究ではシカ肉の、鹿肉中の *Sarcocystis* 属に注目して、保蔵・加熱、冷蔵、冷凍、塩蔵、酸・アルカリ処理における死滅条件を検討した。この結果は、今後野生鳥獣由来食肉の衛生管理マニュアルに関して、改正が検討される際には、同食肉の加工から調理工程における寄生虫対策を講じる上での科学的根拠として活用できると思われる。

A. 研究目的

近年、野生鳥獣による農作物への被害が深刻化してきている。そのため野生鳥獣の適正な管理を行うため、「鳥獣の保護及び狩猟の適正化に関する法律」が改正され、捕獲した野生鳥獣の食用としての利活用が可能となった。しかし、イノシシやシカといった野生鳥獣は、牛や豚などの産業動物と異なり生産者の管理下で育成されていないため、食中毒危害物質を有している可能性が高いが、と殺時の病気の有無等の検査

が義務づけられておらず、これらの動物由来の肉の食品衛生上の安全は担保されていない。厚労省は平成26年11月野生鳥獣肉（ジビエ）の安全性を確保するため、「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針（ガイドライン）」が策定した。平成27年度に行った我々の調査では、野生シカ肉におけるサルコシスティス属寄生虫感染は47検体中36検体で見られ、陽性率（77%）であった。昨年作成された野生鳥獣由来食肉の衛生管理に係るガイドライン

では、寄生虫対策として75℃ 1分以上の加熱を推奨しているが、シカ肉に高頻度に寄生するサルコシステイス属の耐熱性を含む物理化学的性質に関しては、報告がない。

本研究では、シカ肉への高い感染率を示すサルコシステイス属寄生虫に着目し、冷蔵冷凍耐性、熱耐性、塩耐性、酸アルカリ耐性について詳細に検討し、科学的根拠に基づく適切なガイドラインの作成に資することを目的とした。

B. 研究方法

供試材料および試薬

シカ肉（ロースおよび横隔膜）は、平成27年9月7日～平成28年1月22日の期間中、

（株）YAMATO（山梨）より購入した。狩猟解体後ブロック肉として、冷凍せずに4℃にて冷蔵したものを2日以内にクール宅急便で送付されたものを用いた。筋肉小片をスライドガラスで圧片し顕微鏡で観察する簡易検査法でサルコシステイス属寄生虫のシストを確認したものを実験に供した。

試薬として、ペプシン（1:10000, 和光純薬製）、Percoll（GLヘルスケアージャパン（株））、トリパンブルー（ナカライテスク）、PBS(-)（ニッスイ（株））、ニュー硝素（千代田商工（株）：NaNO₂:5%, KNO₃:10%, NaCl:85%）を用いた。器具としては、ガラス毛細管（どらモンド社製、200μL容）、オイルバス（テックジャム（株））、データロガーSK-LT200 II（佐藤計量器製作所製）を用いた。

2. 検査対象

シカ肉に寄生するサルコシステイス属寄生虫³である*S. fayeri*, *S. sybillrennsis*, *S. wapiti*, *S. sp*等を対象とした。

3. ブラディゾイトの生死判定法

①消化試験法

肉片を被検体に用いる場合に、消化試験法によりブラディゾイトの生死判定を行った。Scheme 1に示すように、被検体に、ペプシン2gを塩酸1.5m lに溶かしDWで100m lにメスアップ調整したペプシン消化液を10倍量加え、pH2.2に1N HClで調整後、10分間反応させた。1N NaOHでpH7に調整し反応を止めた後、遠心（1,800 rpm, 10分間、室温）し、沈査を、Percoll液 9 volumeに9% NaClを1 volumeの割合で加えたPercoll調整液に重層し、遠心（1,800 rpm, 10分間、室温）後、一番底の画分をPBSで三回洗浄した。沈査を20μLとり、0.5% トリパンブルー液を同量加えたのち、スライドグラス上に滴下して、顕微鏡で観察した。

②ガラス毛細管法

4℃冷蔵の横隔膜検体からブラディゾイトをあらかじめペプシン消化法で調整したのち、血球計算版でブラディゾイト数を計測し、10³ブラディゾイト/mLになるようPBSで調整し、200 μL容ガラス毛細管に入れ、両端を火炎封入した。処理後、ガラスキャピラリー内の溶液から20μLとり、0.5% トリパンブルー液を同量加えたのち、血球計算版により生死ブラディゾイトの割合を計算した。

4. ブラディゾイトの生死実験

①冷蔵耐性実験

冷蔵温度によるブラディゾイトの生存実験として、シカ肉（ロース）から約50gを切り出し、10gずつ分割し、食品包装用ラップフィルムで包んだあと、冷蔵冷凍用ポリエチレン袋に入れ、24時間・72時間・120

時間・168時間後にサンプリングを行った。温度設定として、4℃は家庭用冷蔵庫を用いた。0℃（氷温）は、発泡スチロール製の保冷容器を氷キューブで満たし常に0℃を確保できるようにした。

②冷凍耐性実験

冷凍温度による実験は、-20℃では家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍室を用い、-30℃では実験用定温冷凍庫（日本フリーザー（株））、-80℃では実験用定温冷凍庫（日本フリーザー（株））を用いた。

サンプリングは-80℃では1時間後と2時間後、-30℃では1時間後と4時間後、-20℃では2時間後と6時間後に行った。

経時的にサンプリングした検体は、消化試験法により、ブラディゾイトの生存を顕微鏡で確認した。①および②のすべての温度帯で、データロガーSK-LT200 IIを用いて自動温度記録を行った。

③熱耐性

加熱温度による実験では、インキュベータ（恒温槽）の温度設定を70℃、65℃、60℃、55℃としてキャピラリー（n=3）で浸漬（1分、3分）を行い、取り出したサンプルを等量のトリパンブルー染色液で染色を行い、血球計算板で生存数をカウントする。

④酸アルカリ耐性実験

酢酸と水酸化ナトリウムを使用して、pH3.0、5.0、7.0、10.0液を調整し、それぞれの液を異なる容器に250mLずつ入れた。シカ肉（ロース）10gずつn=5で分割したロース肉を完全に水溶液に沈ませ、各容器を4℃の冷蔵庫に保存した。24H、72H、120H、168 Hごとにサンプリングし、消化試験法により、ブラディゾイトの生存を顕微鏡で確認した。

⑤塩耐性実験

シカ肉でハム、ソーセージを作成とした場合、前処理としてハムでは6%の塩および2%の発色剤（ニュー硝素）に浸漬する方法が一般的であり、ソーセージの場合は2.5%の塩および0.25%の発色剤（ニュー硝素）を肉に混ぜ合わせる工程をふむ。本実験ではこの工程でサルコシステイス属にどのような影響があるかを検討した。

シカ肉（ロース）から約50gを切り出し10gずつ分け、24H、72 H、120 H、168 Hごとにサンプリングを行った（n=5）。6%の塩および2%のニュー硝素に浸漬および2.5%の塩および0.25%のニュー硝素で塗抹した検体を容器にいれ、4℃の冷蔵庫に保存した。24H、72H、120H、168 Hごとにサンプリングし、消化試験法により、ブラディゾイトの生存を顕微鏡で確認した。

陰性対照として、ニュー硝素の最終濃度が2%、1%、0.5%および0.25%になるように調整し、約50gのシカ肉（ロース）に、浸漬または塗抹し、容器ごと4℃の冷蔵庫に保存した。その後 24H、72 H、120 H、168 Hにサンプリングを行い、消化試験法により、ブラディゾイトの生存を顕微鏡で確認した。

C. 研究結果

馬肉に寄生するサルコシステイス フェイアは、生存している場合、シスト膜がペプシン耐性であるため、ペプシン処理ではブラディゾイドは影響を受けず、腸管まで達し、消化器障害を引き起こす。しかしサルコシステイスが死滅している場合は、シスト膜が容易に分解され、中のブラディゾイドも死滅する。この性質を利用して、サルコシステイス属の生死判定にペプシン処理が用いられる³⁾。本実験においても、シ

カ肉のサルコシステイス属の生死判定にペプシン消化試験を用いた。すなわち、消化試験後に トリパンプルーにより染まれば死滅しており、染まらなければ生存していると判定される (Fig. 2)。

シカ肉 (ロース) に寄生するサルコシステイス属は、温度緩衝に関する実験のうち家庭用冷蔵庫4℃では、168H (7日間) まで生存していた。氷温0℃で保存した場合でも、同様にブラディゾイトは168H (7日間) において生存していた。一方冷凍実験では、-80℃および-30℃において1Hで死滅し、家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍室-20℃では2Hで死滅した (Table 1)。

加熱実験では、ブラディゾイトは70℃では1分で100%死滅、60℃では3分で100%死滅、1分では62%、55℃3分では30%、1分では12%が死滅した。

pHの濃度差に関する実験では、pH3.0およびpH10.0では24Hで死滅した。一方pH5.0とpH7.0では168H (7日間) において生存が確認された (Table 2)。

塩および発色剤での実験では、6%の塩および2%の発色剤の混合液への浸漬および2.5%塩および0.25%発色剤の混合物の塗抹条件では24Hで死滅した。

この実験では発色剤と塩との混合液での影響をみているため、対照として発色剤のみの影響を調べた。その結果発色剤のみ2%の水溶液に浸漬した場合24Hで死滅した。しかし1.0%、0.5%、0.25%の発色剤の浸漬または塗抹では、4℃で168H (7日間) 保存しても、ブラディゾイトは生存していた。

D. 考察

シカ肉には、腸管出血性大腸菌、E型肝炎

など食中毒危害微生物が存在することはすでに報告されているが、多くの場合、解体中に腸管内容物が汚染したことが原因である。しかし、我々が注目したサルコシステイス属は、筋肉に直接寄生するため喫食する可能性が非常に高い。さらにわれわれの調査から、その寄生率が77%以上であることが明らかになった。シカ肉に寄生するサルコシステイス属寄生虫が、食中毒原因物質となった事例が報告されていることから、その予防法をガイドラインに含むことが喫緊の問題と考えられる。

本研究の結果、シカ肉に寄生するサルコシステイス属は、氷温以上では7日間は生存していることが明らかになった。しかし、冷凍には弱く-20℃では2時間、-30℃および-80℃では1時間で死滅することが明らかになった。すなわち、冷蔵耐性には強いが冷凍耐性には弱いことから、一般冷凍庫における冷凍でも効果があるといえる。一方熱耐性では、60℃で3分以上加熱すれば100%死滅することがわかった。70℃では1分で100%死滅することから、短時間での処理においては70℃が効果的であると考えられる。自治体が定める独自のガイドラインとして65℃で30分加熱して食べるという調理方法では、シカ肉のように鉄分が多い肉ではおよそ硬くて旨味を味わうことは難しいと考えられるので、薄切りにしたものをしゃぶしゃぶのような調理方法で食べる際、シカ肉の温度が70℃で1分以上曝されれば、加温による効果は期待できる。

酸アルカリ耐性では強酸および強アルカリに対しては耐性がないが、弱酸性および中性では7日間以上生存することが明らかになった。この結果から調理過程での弱

酸性、弱アルカリ処理ではサルコシスティス属の食中毒は予防できないことが示唆された。

シカ肉の有効利用やアウト・ドアブームにより、手作りのハム、ソーセージおよびジャーキーを作成する機会が多くなる。そこで、ハム、ソーセージの前処理に使われる塩分濃度2%を超えるブランチング（まぶし）や水溶液に漬け込む方法のサルコシスティス属への影響を検討した。今回は50gという比較的小さなブロックを用いての結果ではあるが、6%および2.5%の濃度はサルコシスティス属を死滅させる効果を有していた。一緒に混合した発色剤もボツリヌス菌の抑制効果が報告されていることから、発色剤だけの効果を見たところ、2%以上ではサルコシスティス属を死滅させる効果が認められた。肉の大きさや形状によって、今回の効果が認められるかどうかは今後検討を要するが、塩は、サルコシスティス属を死滅させる効果が期待できると考えられる。

今後慣習にたよる、保存方法や加工方法には良い面と危険な面が潜み、科学的な根拠をもって生産者指導を実施し、地域の生産新興にも寄与していかなくてはならない。

E. まとめ

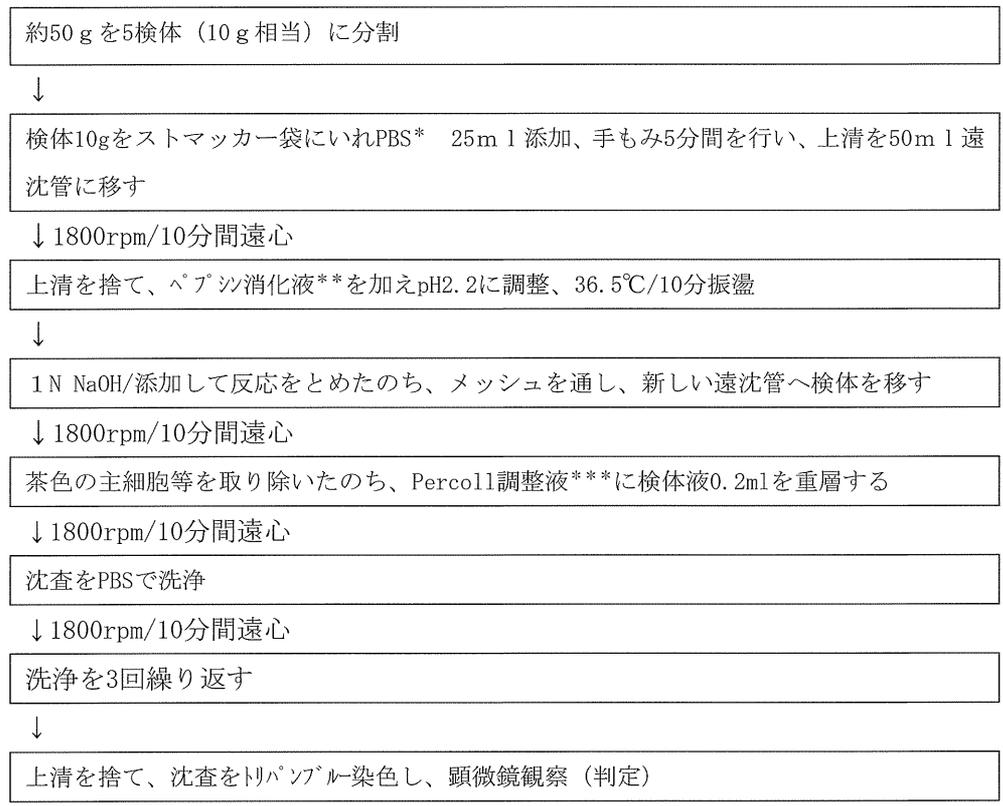
野生鳥獣の食肉の利用促進が全国的に進められており、確実に消費拡大が予想されることから、サルコシスティス属寄生虫の死滅のための条件を検討した。

4℃および0℃（氷温）では、7日間以上の生存が認められた。-20℃、-30℃、-80℃の冷凍保存においては、2時間以内に死滅が

確認された。加温条件下設定の実験では60℃で3分以上、70℃で1分以上処理することで100%が死滅した。更にハム・ソーセージ等の前処理における塩蔵処理では、死滅することが明らかになった。酸アルカリ処理では強酸およびアルカリでは死滅させる効果があった。

F. 参考文献

1. 平成25年度厚生労働科学研究「野生鳥獣食肉の安全確保に関する報告書」2014年3月
2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：S. fayeriの検査法について（暫定版）平成23年8月23日、食安監発0823第1号（2012）
3. 斉藤守弘：住肉胞子虫および住肉胞子虫症．日獣会誌、42、383-388（1989）
4. 馬肉虫に含まれる住肉胞子虫の危害消失条件の検討による生食用馬肉を共通食とする食中毒事例の発生防止対策に関する研究、日本食品衛生微生物学雑誌、54(3)：198-203, 2013.
5. シカ肉中のSarcosystisが原因と疑われた有症、日本食品衛生微生物学雑誌、30（1）：28-32, 2013.



Scheme 1. Protocol for determination of live bradyzoite

*PBS:ダールハッコPBS(一)

**ペプシン消化液 (人工胃液) : ペプシン2gを塩酸1.5m l に溶かしDWで100m l にメスアップ調整したもの

***Percoll調整液: 市販のPercoll液 9 volumeに 9% NaCl を1 volume 加えたもの

Temperature	Time	Time to kill bradyzoid
4°C	30min	<168h
0°C	58min	<168h
-20°C	20min	2h
-30°C	10min	1h
-80°C	8min	1h

pH concentration	detection of bradyzoid			
	24h	72h	120h	168h
strage time				
pH3.0	(-)	/	/	/
pH5.0	(+)	(+)	(+)	(+)
pH7.0	(+)	(+)	(+)	(+)
pH10.0	(-)	/	/	/
(-) means dead				
(+) means live				
/ means not measured				

Salt Cocertation	Food addition Concentration	24 h		72h		120h		168h	
		Soaking	Smear	Soaking	Smear	Soaking	Smear	Soaking	Smear
6.0%	2.0%	(-)	(-)	/	/	/	/	/	/
2.0%	0.25%	(-)	(-)	/	/	/	/	/	/
6.0%	-	(-)	(-)	/	/	/	/	/	/
2.0%	-	(-)	(-)	/	/	/	/	/	/
-	2.00%	(-)	(-)	/	/	/	/	/	/
-	1.00%	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
-	0.50%	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
-	0.25%	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
(-) means dead									
(+) means live									
/ means not measured									

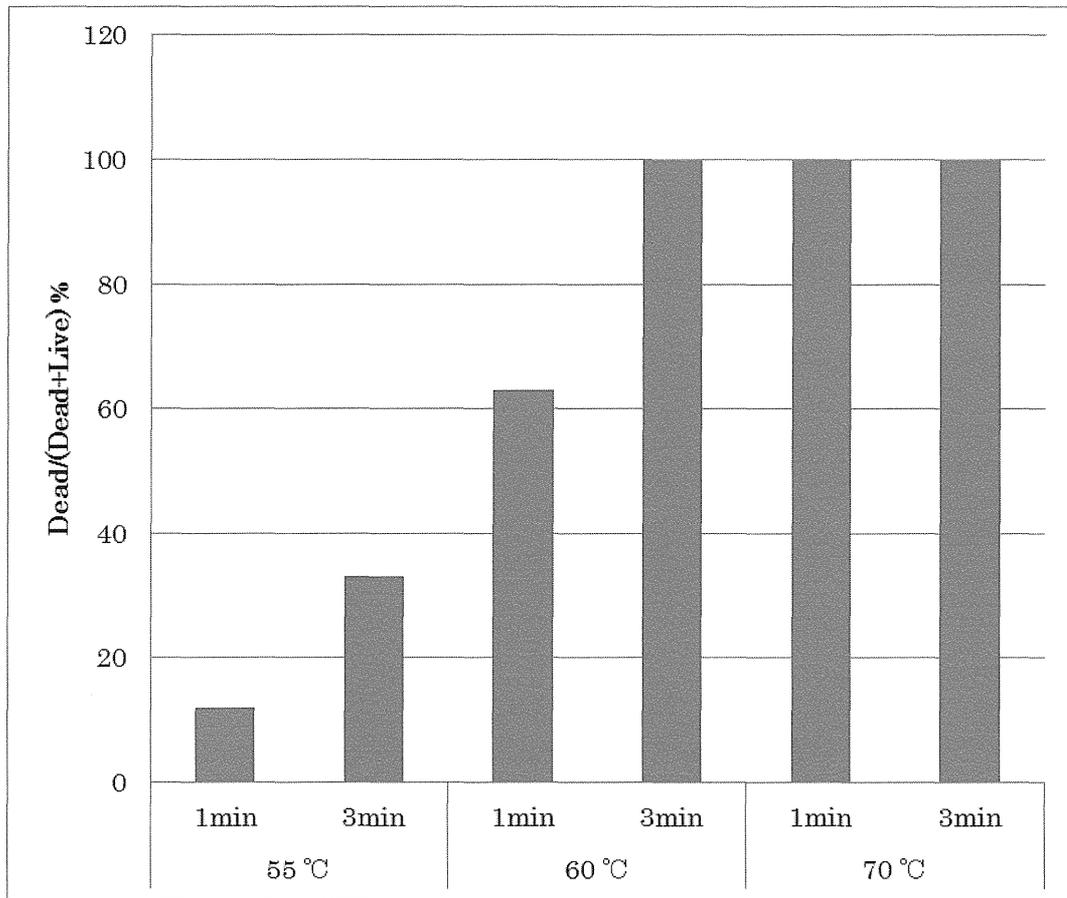


Fig.1 Effect of heat on bradyzoid of Sarcocystis

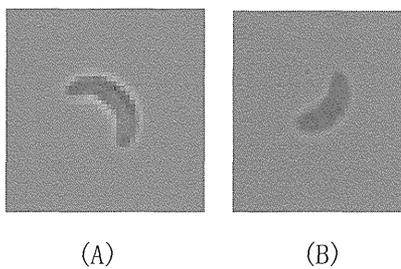


Fig.2 Photographs of live and dead bradyzoid

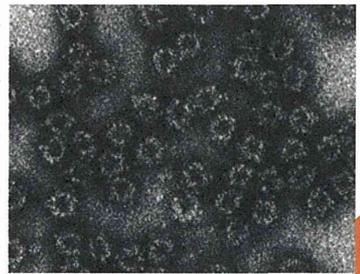
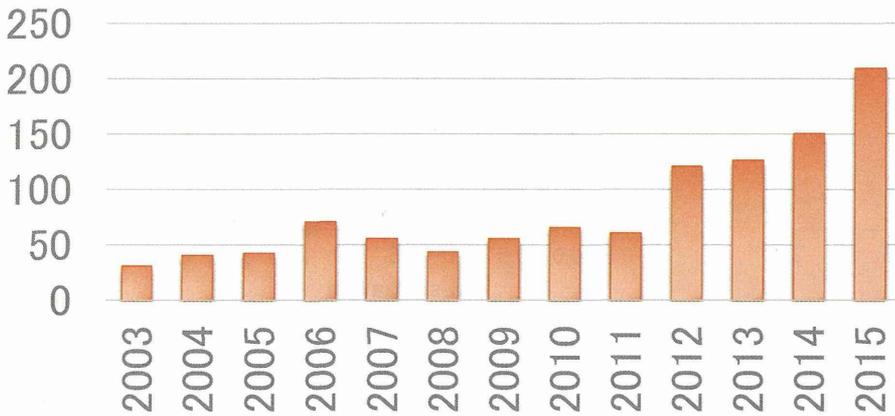
- (A) Live: not stained by trypan blue
- (B) Dead: stained by trypan blue

Ⅲ. その他

「研究班会議資料」

E型肝炎ウイルス(HEV)

- ヒトで肝炎症状、稀に劇症化
- 年間2千万人が感染、300万人以上が急性E型肝炎を発症、56,600人がE型肝炎に関連して死亡(WHO,Hepatitis E Fact sheet, 2014)
- 開発途上国:水系感染(遺伝子型1,2)
- 先進国:動物由来感染(食肉由来)(遺伝子型3,4)
 - 2003年兵庫県における野生シカ肉からの感染



国立感染症研究所ウイルス第二部

HEPATITIS E: AN EMERGING GLOBAL DISEASE – FROM DISCOVERY TOWARDS CONTROL AND CURE

