

「調理方法等に関する研究」

国立医薬品食品衛生研究所：朝倉 宏

平成 28 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
加工調理施設における衛生管理と加熱条件設定等に関する研究

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
研究分担者	壁谷英則	日本大学生物資源科学部獣医学科
研究協力者	品川邦汎	岩手大学
研究協力者	渡邊真弘	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	高橋和志	北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課
研究協力者	池田徹也	北海道衛生研究所感染症部細菌グループ
研究協力者	高橋隆太	千葉県健康福祉部衛生指導課
研究協力者	水野浩子	愛知県健康福祉部保健医療局生活衛生課

研究要旨： 3 自治体及び関連施設の協力を得て、野生鳥獣由来食肉の加工調理段階の衛生管理に関する諸検討を行った。自治体 A では鹿肉の加工販売・調理施設を視察し、衛生管理実態を把握した。加工販売施設でのカット工程は、国及び自治体のガイドラインに従い、トレーサビリティ確保の他、原材料受入から製品化に至る工程で、温度管理記録や他の食肉とは独立した加工環境の確保等、HACCP 導入型管理運営基準への対応が進められていた。実際に同施設の製品における細菌汚染状況は、同施設で加工販売された他食肉と比べて同等もしくはそれ以上であった。また、同自治体管内の調理施設では鹿肉ローストをスチームコンベクションオーブンをを用いた低温加熱調理により調理していたが、その過程ではブロック肉の芯温測定が実施されていた。これを受けて、スチームコンベクションオーブンをを用いて 100g 重量の鹿肉を低温加熱調理した場合の芯温の経時挙動を測定すると共に、志賀毒素産生性大腸菌 O157 の添加回収試験を行い、芯温が 65℃で 30 分間加熱した場合には少なくとも 4 対数個の低減を示すことに加え、同等の殺菌効果を示す加熱条件を例示した。自治体 B では猪肉加工施設において、猪挽肉加工機の洗浄方法等、施設器具の取扱いについては衛生的であった一方、揚物に使用するパン粉からは大腸菌群が検出される状況を把握し、同施設内における交叉汚染要因として今後対応が必要である旨の情報を収集することができた。自治体 C では、2 施設由来調理品の細菌汚染状況を検討し、うち 1 施設由来の鹿肉ロースト製品については、大腸菌群が検出される状況を把握し、加熱調理条件及び衛生管理状況に関して、更なる情報収集が必要であると考えられた。この他、関東甲信越地方の調理施設にて、施設環境及び製品の加熱前後における細菌数挙動を求め、ジビエ肉の取扱前後でのまな板・包丁等の汚染菌数変動が顕著であり、改めて洗浄消毒の意義が提唱される成績を得た。また、同重量で同時調理したにも関わらず、加熱後の検体温度が検体間で著しく異なる成績を得た。今後は、他の加工調理形態の関連施設での衛生管理状況の把握を行うと共に、加熱調理時の検体温度決定要因についての探索等を通じ、望ましい調理方法等に関する情報の集積を図りたい。

A. 研究目的

近年の農林水産業をめぐる鳥獣被害の増加を受けて、鳥獣保護法が改正され、捕獲頭数の増加と食用としての利活用が増加すると見込まれている。厚生労働省では、2015年度に野生鳥獣肉の衛生管理ガイドラインを作成し、食用に供される際の安全性確保に寄与するための対策を講じてきた。しかしながら、野生鳥獣由来食肉に関わるフードチェーンにおいては、一般家畜とは異なる法制度の下で運用されているところもあり、食品としての安全性確保にあたっては、各工程における衛生管理実態の把握ならびにその改善指導が求められている。

こうした背景を受け、本分担研究では複数の自治体の協力を得て、鹿肉及び猪肉の加工調理施設を対象とした衛生管理実態の把握ならびに調理時の微生物汚染低減手法として低温加熱調理を例として加熱条件に関する検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 調査対象施設及び内容

1) 平成 28 年 11 月に自治体 A 管内の鹿肉加工販売施設を視察し、同施設の拭取り及び鹿肉製品を入手した。また、同施設における加工工程での衛生管理要件に関して情報提供を求めた。また、同日に鹿肉を取り扱う調理施設を訪問し、鹿肉ローストの調理工程の再現を求め、同工程での管理要件等を聴取した。

2) 平成 28 年 10 月に、自治体 B 管内にある猪肉加工施設及び調理施設を訪問し、同施設での拭き取り検体及び猪肉製品を入手した。また、同加工・調理工程における衛生管理手順等に関する情報提供を求めた。

3) 平成 28 年 9 月上旬及び 11 月に、自治体 C 管内の調理施設 2 施設より、調理品(鹿肉ロースト及び猪メンチカツ)の提供を受けると共に、後者施設からは加工調理器具等の拭き取り検体を併せて入手した。

4) 平成 29 年 1 月に、調理施設 D にて、事業者により鹿肉・猪肉のローストの調理工程を再現し、同工程での施設器具ふき取り検体及び食品検体を確保し、各種試験に供した。

2. 細菌試験

(i) 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 分間ボルト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 倍段階希釈溶液を作成し、標準寒天培地、Violet Red Bile Glucose (VRBG) 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、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。

(ii) STEC 及びサルモネラ定性試験
上記 2. で調整した懸濁溶液残液を 37℃ にて 18 時間培養後、培養液 1mL を 1.5mL 容エッペンドルフチューブに分注した。16,000 x g 以上で 5 分間遠心後、上清を

取り除き、沈査に 100 μ l 滅菌蒸留水を加えて、95 $^{\circ}$ Cにて 5 分間加熱し、DNA 抽出液とした。これを鋳型として、サルモネラ属菌及び STEC の *stn* 遺伝子及び *stx* 遺伝子に対する PCR 法を行い、両菌の定性検出とした。

3. 菌叢解析

検体由来 DNA 抽出液を鋳型として、16SrRNA799f-1179r オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 反応を行い、E-gel SizeSelect 2 % (Thermo Fisher) および AMPure XP (Beckman) を用い、増幅産物を精製した。同精製物を定量後、等量混合ライブラリーを作成し、Ion Chef / Ion PGM システム (Thermo Fisher) を用いた barcoded pyrosequencing 解析に供した。取得配列データは、CLC Genomic Workbench (キアゲン) を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline へ投入し、取得配列の階層化分類等を行った。

4. 加熱条件の設定

1) 検体中心部分が 63 $^{\circ}$ C・30 分間の加熱を充たす加熱殺菌量 L の算出

食肉製品の製造基準として用いられる 63 $^{\circ}$ C・30 分間の加熱条件が検体内部において満たされた場合の殺菌加熱量を以下の式①により求めた。

$$L = t \times 10^{(T-T_r)/Z} \quad (\text{式①})$$

(t : 加熱時間 (分)。ここでは 30 を採用、 T : 測定温度、 T_r : 基準温度、 Z : STEC O157 を用いた既報値 (4.61) を採用)

2) 異なる温度条件下で検体中心温度が

63 $^{\circ}$ C・30 分間と同等性を示す加熱時間の算出

100 g 重量の鹿モモ肉ブロックを 4 $^{\circ}$ C 保存後に、複数温度 (55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C) に設定したスチームコンベクションオープン (タニコーTSCO-4GBN3) を用いて、低温加熱調理に供した。加熱にあたっては温度ロガー (Madge Tech 社 HiTemp140) を用いて検体芯温を 30 秒毎に測定・自動記録し、以下の式②を用いて各測定時間での部分的殺菌価 $[L]$ を求めた。 $[L] = (L_i + L_{i-1}) / 2 \times \Delta t_i$ (式②)

($L_i + L_{i-1}$ は連続した L 値の合計、 Δt_i : 測定時間間隔 (分)。ここでは 0.5 を採用)

その後、加熱時間全体での殺菌価 (全体殺菌価) を、 $\Sigma [L]$ として求めた。

5. 志賀毒素産生性大腸菌 O157 を用いた鹿肉での添加回収試験

約 1.2-1.4E+04CFU の志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O157:H7 3 株 (266 株、466 株、470 株) 混合菌液を、30G ニードルを用いて 100g 重量の鹿モモ肉中心部に接種した。4 $^{\circ}$ Cにて 1 時間保存後、同検体をスチームコンベクションオープン (タニコーTSCO-4GBN3) に入れ、65 $^{\circ}$ Cの温度設定条件にて 15、20、25、30、60 分間加熱した。加熱後は速やかに大型滅菌ストマッカー袋に入れ、氷水で冷却させた。その後、滅菌鋏で検体を細切し、900mL の緩衝ペプトン水 (BPW, pH7.4) を加えて 1 分間ストマッキング処理を行った。懸濁液については、その後、上項に記載した一般細菌数及び腸内細菌科菌群の定量試験に供すると共に、クロモアガーSTEC 寒天培地 (関東化学) を用いて、接種菌の定量検

出を行った。

C. 結果

1. 衛生指標菌・主要病原細菌の検出状況

供試検体は、何れも STEC 及びサルモネラ属菌陰性を示した。各施設にて採材した検体からの衛生指標菌数の検出状況ならびに衛生管理実態等について以下に述べる。

1) 自治体 A 管内の加工販売、調理施設

自治体 A 管内の加工販売施設 A1 では他畜産物とは独立した区域を設定し、特定の鹿部分肉を真空包装された形で受取、使用まで冷蔵保管していた。同施設の冷蔵庫内部温度については、1日2回モニター・記録していた。加工に先立ち、服装や手指の洗浄に関するマニュアルのほか、包丁やまな板等の調理器具の使用後洗浄・消毒マニュアルを確認した。包丁については UV 殺菌灯照射容器内にて使用まで保管していた。

実際に鹿肉の細切作業を実施した後のまな板、包丁（片面）についてふき取りを行い指標菌を定量したところ、一般細菌、腸内細菌科菌群、大腸菌群は陽性となり、それぞれの平均値は $1.4E+06CFU/100cm^2$, $8.5E+02CFU/100cm^2$, $1.15E+03CFU/100cm^2$ であった（表 1）。大腸菌及び黄色ブドウ球菌は何れも陰性であった（表 1）。作業終了後、販売ブースに並べられた包装後鹿肉製品について、同日に加工された豚肉製品と共に指標菌数を求めたところ、部位等による差異は認められたものの、いずれの製品も大腸菌、黄色ブドウ球菌は陰性を示した他、特に腸内細菌科菌群数平均値は、豚肉製品が $1.07E+04CFU/g$ であったのに対し、鹿肉製品は $8.46E+02CFU/g$ と、

1g あたり 1 対数個以上少ない結果となった（表 1）。なお、供試対象製品については、何れも製品のラベルに、加工事業者名、加工日、消費期限（加工日を含め 3 日間）の情報と共に消費者が同個体に関する情報をトレースできるような記録が見受けられた。

菌叢解析の成績は、上述の指標菌動態を裏付けるように、施設ふき取り検体の多くは、*Pseudomonas*, *Delftia*, *Arthrobacter* 属等の環境由来細菌が主体であり、鹿肉・豚肉製品についても、低温熟成加工処理を受けて製造された鹿肉ベーコン 1 検体を除き、*Pseudomonas* 属が最も優勢な菌属であることが確認された。

以上、複数の点で施設 A1 については、衛生管理が良好である知見が得られたことを受け、当該施設の状況を参考としつつ、鹿肉の加工（カット等）工程における管理運営基準の一例を以下に示した。

① 納品形態

原材料の納入元は、解体処理施設を特定でき、かつ定期的な納品を可能とする事業者であることが望ましい。納品日を事前に計画することは、計画的な加工処理および保存時の原材料の取り違え防止に役立つと思われる。なお、納品に際しては、交叉汚染を防止するため、他の畜産物と完全に振り分けた形で輸送されることが望ましい。

② 原材料の保存形態

部分肉として真空包装形態で製品となったものを使用することが望ましい。また、冷凍品を用いることが微生物学的品質上、より望ましいが、冷蔵品を用いる場合には

特に保存中の温度管理及び他原材料との区別化、容器包装の破損の有無等の確認、記録に留意する必要がある。

③ 加工処理区域等

加工施設には室温を目視確認できるよう、温度計等を設置し、作業前に確認・記録すること。鹿肉等の野生鳥獣由来食肉の加工処理にあつては、他の畜産物と区別された専用の加工処理台、加工調理器具（包丁・まな板等）等を用いること。また、スライサーを使用する場合には、専用の器具を用いることが望ましいが、これが困難な場合には、交叉汚染防止のため、他の畜産物に先行して処理を開始することが望ましい。挽肉作業については、スライス等の作業と独立して行うこととし、同作業が発生する場合には、交叉汚染防止の観点から、作業前後に必ず器具及び作業台等を清掃し、アルコール系薬剤を用いた消毒を行うこと。加工後の製品は、速やかにオートパッカー等での包装、入力・印字等を行うことが望ましい。上記作業の実施者、実施日時、使用原材料、加工方法、加工量、清掃・消毒の記録を取り、一定期間保存すること。なお、器具・機材の使用後に清浄化するための手順書を作成し、実施記録を付すこと。

④ 製品の消費期限等について

他の畜産物と同様、加工事業者が消費期限を定め、製品への記載を行う必要がある。その際には加工日等の記載を含めることが望ましい。また、他の畜産物と同様、10℃以下での保存を行う旨を記載すること。

⑤ トレーサビリティについて

一部の鹿肉原材料については、個体識別番号を用いたトレーサビリティ体制が確立されているが、こうしたシステムを有する

解体処理施設にて生産された原材料を用いることは、加工処理施設におけるトレーサビリティ確保ならびに消費者への情報開示の観点からも有用と考えられる。こうしたシステムがない原材料を用いる場合にも、解体処理施設或いは第一次加工施設を特定することで一定のトレーサビリティは確保されることが考えられる。いずれの場合も、処理施設、納入業者等の記録を取り、期間を定め保存すること。

鹿肉の調理施設 A2 では、鹿肉ローストの調理工程を視察した（図 2）。当該施設では、冷凍鹿ロース肉を 1～2 日間冷蔵温度帯にて解凍した後、筋取り等を行い、フライパンで表面に焼き目をつけ、その後スチームコンベクションオーブンをを用いて低温加熱調理を行っていた。同装置には芯温計が付属しており、当日はこれを用いて鹿ブロック肉の芯温を測定した。加熱処理後は、ブロック肉を調理台上に設置した吊り下げ式のハロゲン照明の下に移動させ、ブロック肉中心部の温度上昇を促した後、切り分けを行った。同調理を経た調理品の細菌汚染菌数は概して低く、腸内細菌科菌群はわずかに検出されていたものの、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌は何れも陰性となった（表 1）。使用後の包丁片面からは一般細菌数が $1.5E+02CFU/100cm^2$ 検出されたが、他の指標菌については何れも陰性であった（表 1）。

2) 自治体 B 管内の加工、調理施設

猪肉の加工（カット、ミンチ、揚げ物）を行う施設 B1、ならびに猪肉調理施設 B2

を視察し、施設拭き取り検体および原材料を採材し、細菌検出試験に供した（図 3）。成績概要については表 2 に記す。猪肉加工施設 B1 では使用前のまな板、包丁、並びに調理器具としてミンチプロセッサを拭き取り対象とした。これらは何れも腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌陰性となった。一方、揚げ物（メンチカツ等）を加工する際に使用しており、常温保存していたパン粉検体からは、 $6.51E+04$ CFU/g の一般細菌のほか、 $5.75E+02$ CFU/g の腸内細菌科菌群、 $1.13E+02$ CFU/g の大腸菌群が検出された（表 2）。

調理施設 B2 では、冷凍猪肉を特定業者より仕入れ、スライサーで調理従事者が薄切りしたものを調理に用いていた（図 3）。スライサーは使用後、洗剤を用いて洗浄後、エタノール系消毒剤で消毒を行っていたが、使用前のスライサー刃を拭き取り検体とした結果、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌は検出されず、適切な衛生管理を行っていると考えられた。また、スライス後の猪肉（モモ、バラ）から腸内細菌科菌群及び大腸菌群は検出されたものの、大腸菌は検出されなかった（表 2）。

3) 自治体 C 管内の加工調理施設

当該自治体管内にある施設 C1 および C2 より、調理品である、鹿肉ローストおよび猪メンチカツの提供を受けた。鹿肉ロースト検体からは、一般細菌数が $2.5E+04$ CFU/g、腸内細菌科菌群数が $2.1E+03$ CFU/g、大腸菌群が $1.6E+03$ CFU/g 検出されたが、大腸菌は検出されなかった（表 3）。一定の腸内細菌

科菌群が検出された状況を受け、当該検体の構成菌叢を 16S rRNA Pyrosequencing 解析により調査した結果、腸内細菌科菌群の主体は *Raoultella* 属、*Serratia* 属、*Morganella* 属等であることが明らかとなった（図 4）。一方、施設 C2 から提供された猪メンチカツ検体については、何れの指標菌も検出されなかった（表 3）。当該調理品の加工調理施設で採材したふき取り検体（図 5）についても、全て腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌は陰性であったが、使用前包丁の一般細菌数については同施設で揚げた後に放熱のために用いるバット等に比べ、若干高値を示した（表 3）。

4) 調理施設 D における調査成績

調理施設 D の研究協力を受け、鹿肉・猪肉のロースト調理における衛生管理状況に関して、調理工程に沿って検討を行った。当該施設では、スチームコンベクションオーブンではなく、一般的なオーブンを使用していた。同施設 D での細菌検出状況として、使用後のまな板等は使用前に比べ、顕著に細菌数を増加させ、大腸菌群及び大腸菌陽性となっており、適切な洗浄・消毒の必要性を指し示す根拠として用いる意義が示された。また、同施設で調理用に使用する上水蛇口を拭き取り調査対象としたところ、大腸菌を含めた各種指標菌が検出された（表 4）、定期的な洗浄・消毒対象箇所とすべきと考えられた。加熱調理後の鹿肉・猪肉調理品のうち、猪肉検体については腸内細菌科菌群および大腸菌群陰性となったが、鹿肉検体については、調理後も大腸菌群陽性を示した（表 4）。両検体は同等の重量と

した後、同時にオープンに入れて加熱調理を行ったが、加熱調理直後のブロック肉芯温については猪肉では約 61℃となっていたが、鹿肉では約 52℃と両検体間で差異が認められた。

2. スチームコンベクションオープンを用いた鹿肉ロースト芯温変化と O157 低減効果.

1) 63℃30 分間と同等の加熱条件設定

鹿モモ肉の中心温度が 63℃で 30 分間加熱された場合と同等の加熱条件を求めるため、まず 63℃・30 分間加熱した場合の加熱殺菌価 L を求めた。同数値は、0.0748315 と試算されたことを受け、次に、特定のスチームコンベクションオープンを複数の温度 (55℃, 60℃, 65℃, 70℃) に設定し、検体投入後に余熱することなく、調理を開始した場合に、同等の加熱殺菌価を示す加熱調理時間を図 6 に示した計算シートを用いて求めた。各温度条件下における鹿肉検体の断面所見及び温度変化については図 7 に示した。最終的に 63℃・30 分間の加熱条件が検体中心部に課された場合と同等とみなされる加熱時間は、55℃で 27 時間 36 分、60℃で 161 分、65℃で 43.5 分、70℃では 31 分と試算された (図 8)。

2) 加熱条件の検証～STEC O157 添加回収試験

上項で求めた加熱条件の妥当性を検証するため、STEC O157 を 100g 重量の鹿モモ肉中心部に 30G ニードルを用いて $1.64E+0^4$ CFU/g となるように接種し、65℃の温度設定をしたスチームコンベクションオープンで加熱調理した際の消長を

一般細菌数及び腸内細菌科菌群数と共に、経時的に測定した。加熱 15 分後の一般細菌数、腸内細菌科菌群数、STEC O157 菌数はそれぞれ $8.37E+03$ CFU/g、 $7.28E+03$ CFU/g、 $7.34E+03$ CFU/g と加熱前検体に比べて大きな低減は認められなかったが、加熱 20 分後には STEC O157 菌数は $4.33E+01$ CFU/g へと大幅な減少を示し、その後、加熱 30 分後には全ての検出対象菌は陰性を示した (図 9)。なお、加熱 30 分後の検体中心温度は、63.1℃に達しており、同条件下において、検体中心温度が 65℃に達するには計 46.5 分の加熱時間を要した (図 9)。

D. 考察

自治体 A 管内の加工販売施設 A1 では、同自治体が定める HACCP 認証制度の承認を得ることも視野にいれた活動を行っており、同施設での管理基準等は、野生鳥獣由来食肉の取り扱いを検討しようとする加工施設等への参考資料となると期待される。

また、自治体 B 管内の加工施設 B1 では、加工器具等は衛生的な状況を担保できていたが、油で揚げる前に使用するパン粉から大腸菌群が検出されていた。その交換頻度や他畜産物への使用状況等については今後情報収集が必要と思われる。

自治体 C 管内の施設 C1 で調理された鹿肉ローストについては、施設事業者への聞き取り調査により、71℃の設定温度で 50-55 分間スチームコンベクションオープンを用いて低温加熱調理を行っていたとの情報を得た。当該工程を経て調理品として供された鹿肉ローストから大腸菌群が検出された成績から、調理施設環境における

衛生管理状況の確認に加え、当該機器使用時の検体芯温測定が必要である旨を自治体 C にフィードバックした。

調理施設 D での調理工程視察を通じ、まな板や包丁等が使用前後で変動する知見を得たほか、加熱条件や検体条件が同等とみなされるにもかかわらず、検体温度挙動に差異が認められたことは興味深い知見として捉えられよう。この差異については、獣種の違いもしくは個体の年齢差に由来する含水量の違いに因る可能性が示唆されており、来年度には本項目についての更なる比較検証を行うことにより、一般的な鹿肉・猪肉の加熱特性に関するより詳細な知見が得られるものと期待される。

加熱調理については、一般社団法人ジビエ振興協会においても、ジビエ食材の特性を鑑みて、スチームコンベクションオーブンの活用が推奨されている。本研究では、本加熱調理手法を用いることで、微生物危害を低減させることを目的に、加熱調理条件の一例を示すと共に、各施設で加熱条件設定を行う際の参考となるよう、温度測定記録を入力することで条件出しを行うことのできるワークシートを作成した。こうした条件設定は検体の種別・大きさ、使用する機器が同一かつ安定的な性能を保持すれば、一度作成することで今後も安全確保に資する条件を自らが設定することのできるものといえる。今後、それぞれの調理施設で用いる加熱調理機を用いて、望ましい加熱条件に関する検証を進めることは、わが国におけるジビエ調理工程における微生物危害管理を充実させる上で、欠かせないものと思われる。

E. 結論

複数の自治体の協力を得て、加工・調理施設等での衛生管理に関わる情報を収集し、衛生指標菌の検出状況等を踏まえ、衛生確保に資すると思われる管理運営基準の一例を作成した。また、調理施設でのジビエ食材の加熱調理において有用性が示唆される、スチームコンベクションオーブンをを用いて、O157 を 4 対数個低減させる加熱殺菌条件設定のための検証方法を作成した。今後、各施設における検証が進むことで、ジビエ食材の安全確保が進展するものと思われる。

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. 自治体 A 管内の鹿肉加工販売施設 A1、調理施設 A2 における細菌検出状況

形状	施設	検体	衛生指標菌数 (CFU/100cm ² または CFU/g)				
			一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
拭き取り	A1	使用後まな板①	1.61E+06	3.00E+02	2.00E+02	ND	ND
拭き取り	A1	使用後まな板②	1.39E+06	1.00E+03	1.05E+03	ND	ND
拭き取り	A1	使用後まな板③	3.33E+05	1.00E+03	8.00E+02	ND	ND
拭き取り	A1	使用後まな板④	2.27E+06	1.10E+03	2.55E+03	ND	ND
拭き取り	A1	使用後包丁(片面)	2.11E+04	ND	ND	ND	ND
食品	A1	鹿肉ベーコン	3.33E+02	ND	ND	ND	ND
食品	A1	鹿肉 ロース	1.56E+06	1.87E+02	1.23E+02	ND	ND
食品	A1	鹿肉 バラ	3.12E+05	2.26E+03	1.28E+03	ND	ND
食品	A1	鹿肉 もも	5.03E+05	8.67E+01	4.67E+01	ND	ND
食品	A1	豚肉肩ロース	2.55E+06	7.49E+03	5.43E+03	ND	ND
食品	A1	豚肉 肩	5.03E+03	9.33E+01	1.33E+01	ND	ND
食品	A1	豚肉 バラ	3.14E+06	2.46E+04	9.45E+03	ND	ND
拭き取り	A2	使用後包丁(片面)	1.50E+02	ND	ND	ND	ND
食品	A2	調理品 (鹿ロースト)	1.70E+03	5.00E+00	ND	ND	ND

ND は検出限界以下を指す。なお、検出下限値は、拭き取り検体では 50CFU/100cm²、

食品検体では 50CFU/g である。

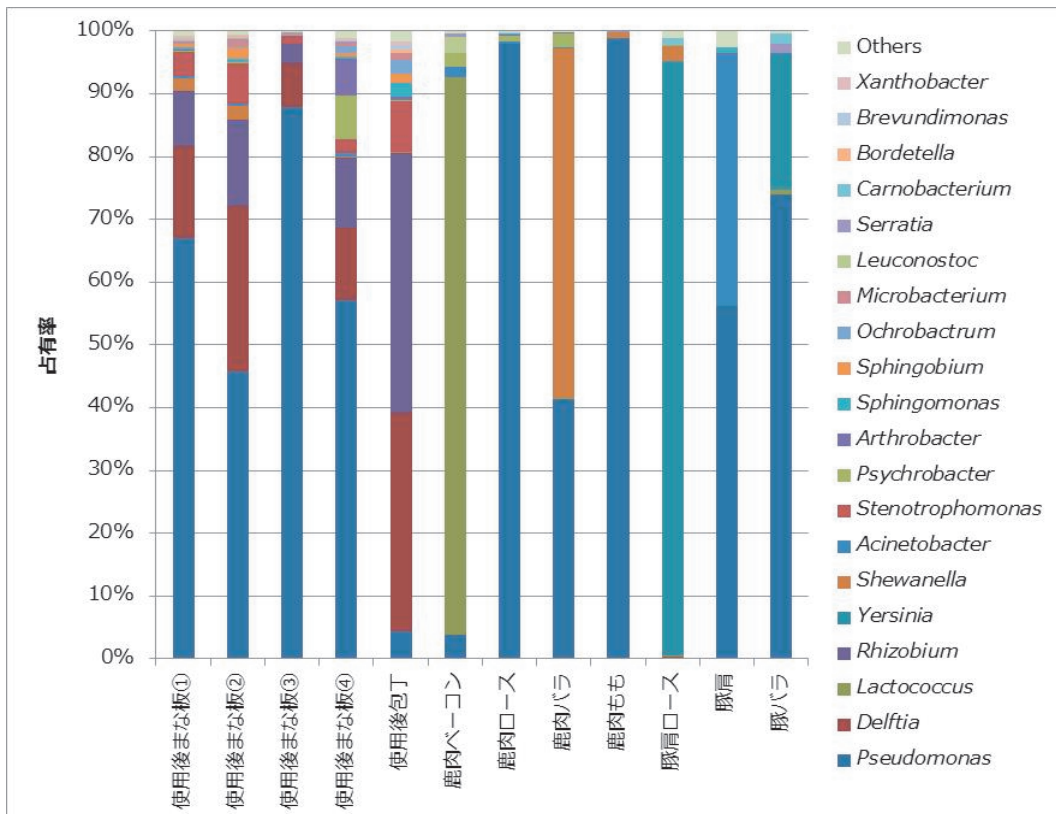


図 1. 施設 A 1 にて採材した検体の構成菌叢比較成績概要.

鹿肉調理施設A2での工程概要 鹿肉のロースト

鹿ロース塊肉を受入れ 供給元は一箇所)

筋等を取り除き、下味をつけた後、
表面に焼き目をつける



表面にスパイスを塗布し、
スチームコンベクションオーブンで
低温加熱調理
(温度ロガーで芯温測定)



切り分け、盛り付け
ハロゲン照明下で余熱調理

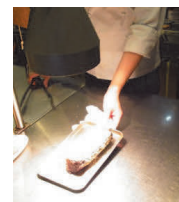


図 2. 鹿肉調理施設 A2 における調理手順の概要.

表 2. 自治体 B 管内の猪肉加工施設 B1 及び調理施設 B2 における細菌検出状況.

形状	施設	検体名	衛生指標菌 (CFU/100 cm ² もしくはCFU/g)				
			一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
拭き取り	B1	使用前ミンチ機投入部	2.25E+03	ND	ND	ND	ND
拭き取り	B1	使用前ミンチ機排出部	8.00E+02	ND	ND	ND	ND
拭き取り	B1	使用前肉調製台①	1.06E+04	ND	ND	ND	ND
拭き取り	B1	使用前肉調製台②	0.00E+00	ND	ND	ND	ND
拭き取り	B1	使用前包丁 (片面)	1.50E+02	ND	ND	ND	ND
食品	B1	使用前パン粉	6.51E+04	5.75E+02	1.13E+02	ND	ND
食品	B2	猪肉バラ	2.55E+04	8.10E+02	4.00E+01	ND	ND
食品	B2	猪肉モモ	8.18E+03	6.67E+01	5.67E+01	ND	ND
拭き取り	B2	使用前スライサー刃	1.00E+02	ND	ND	ND	ND

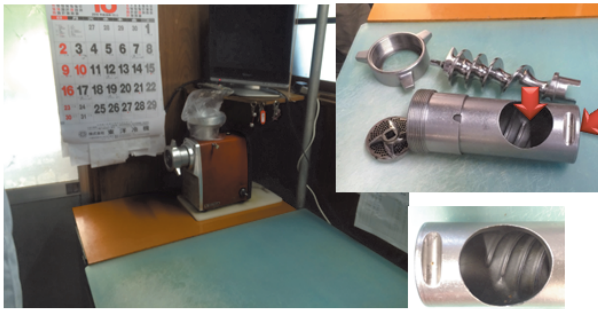
ND は検出限界以下を指す。なお、検出下限値は、拭き取り検体では 50CFU/100cm²、食品検体では 50CFU/g である。

猪肉加工施設B1での工程概要(揚げ物)

①ブロック肉の細断(まな板・包丁)



②ミンチプロセッサで挽肉加工・成形



⑤冷凍状態で調理施設へ出荷



④トレイに並べ、
-30℃冷凍庫内
で一晩保存



③小麦粉・
パン粉をつける



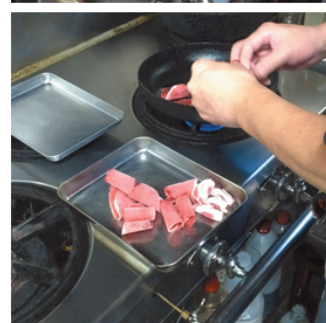
猪肉調理施設B2の工程概要

猪バラ・モモブロック肉を受入れ(供給元は一箇所)

スライサーを用いて、薄切り肉にカット(加工)



スライサー
(刃部分拭き取り)
:使用後は、エタノール系消毒剤で消毒・
清浄して保管



バラ・モモに分けて、小包装後、
冷凍(-20℃)で保存(~1か月)



必要量を取り出し
加熱調理



フライパンで加熱調理

図 3. 猪肉加工施設 B1 及び同調理施設 B2 での作業工程概要

赤矢印は採材対象を示す。

表 3. 自治体 C 管内施設 C1 及び C2 における調理品等からの細菌検出状況.

形状	施設	検体名	衛生指標菌 (CFU/100 cm ² もしくは CFU/g)				
			一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
食品	C1	調理品 (鹿ロースト)	2.50E+04	2.10E+03	1.60E+03	ND	ND
食品	C2	調理品 (猪メンチカツ)	ND	ND	ND	ND	ND
拭き取り	C2	使用前まな板	5.00E+02	ND	ND	ND	ND
拭き取り	C2	使用前包丁 (片面)	7.40E+05	ND	ND	ND	ND
拭き取り	C2	使用前ミートチョッパー	2.70E+03	ND	ND	ND	ND
拭き取り	C2	使用前バット	ND	ND	ND	ND	ND
拭き取り	C2	使用前ディッシャー	ND	ND	ND	ND	ND
拭き取り	C2	使用后ミートチョッパー	4.20E+03	ND	ND	ND	ND
拭き取り	C2	作業前作業者手指 (手袋)	0.00E+00	ND	ND	ND	ND
拭き取り	C2	使用前トング	ND	ND	ND	ND	ND

ND は検出限界以下を指す。なお、検出下限値は、拭き取り検体では 50CFU/100cm²、

食品検体では 50CFU/g である。

表 4. 調理施設 D における細菌検出状況

検体形状	検体	衛生指標菌数 (CFU/100cm ² または CFU/g)				
		一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
拭き取り	調理前 まな板左	1.7E+3	ND	ND	ND	ND
	調理前 まな板右	3.7E+3	1.0E+2	ND	ND	ND
	調理前 包丁 (片面)	2.1E+3	ND	ND	ND	ND
	水道蛇口 左	3.2E+3	1.0E+2	2.0E+2	ND	ND
	水道蛇口 右	6.7E+3	8.0E+2	6.0E+2	ND	ND
	鹿シタマ塊表面(原材料)	5.0E+4	ND	ND	ND	ND
	猪モモ塊表面 (原材料)	3.1E+3	2.0E+2	1.0E+2	1.0E+2	ND
	調理後 まな板左	1.5E+4	6.0E+2	6.0E+2	ND	ND
	調理後 まな板右	7.6E+4	9.8E+3	7.0E+3	4.0E+2	ND
	調理後 包丁片面	3.2E+3	1.0E+2	ND	ND	ND
食品	調理前 猪モモ	4.4E+3	1.0E+2	2.0E+2	ND	ND
	調理後 猪モモ	6.0E+2	ND	ND	ND	ND
	調理前 鹿シタマ	9.4E+3	ND	1.0E+2	ND	ND
	調理後 鹿シタマ	2.6E+4	ND	1.0E+2	ND	ND

ND は検出限界以下を指す。なお、検出下限値は、拭き取り検体では 50CFU/100cm²、食品検体では 50CFU/g である。

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
2	65°C加熱	温度、T	△値	測定時間間隔△t _i	部分的積算値(L _i)	全体積算値									
3	処理時間	(min)	△=10 ^(7-T/4.41)	(min)	[L _i =(L _{i-1} +L _i)/2]×△t _i	Σ[L _i]									
4	...														
5	0.0	8.48	0.00000000000000												
6	0.5	10.14	0.00000000000000	0.5	0.00000000000000	0.00000000000000									
7	1.0	11.9	0.00000000000000	0.5	0.00000000000001	0.00000000000001									
8	1.5	13.23	0.00000000000000	0.5	0.00000000000002	0.00000000000002									
9	2.0	14.43	0.00000000000001	0.5	0.00000000000003	0.00000000000005									
10	2.5	15.61	0.00000000000001	0.5	0.00000000000005	0.00000000000011									
11	3.0	17.39	0.00000000000003	0.5	0.00000000000012	0.00000000000022									
12	3.5	19	0.00000000000007	0.5	0.00000000000026	0.00000000000048									
13	4.0	20.68	0.00000000000016	0.5	0.00000000000059	0.00000000000107									
14	4.5	22.49	0.00000000000041	0.5	0.00000000000143	0.00000000000250									
15	5.0	24.15	0.00000000000093	0.5	0.00000000000335	0.00000000000585									
16	5.5	26.06	0.00000000000242	0.5	0.00000000000838	0.00000000001423									
17	6.0	27.91	0.00000000000610	0.5	0.00000000002130	0.00000000003553									
18	6.5	29.59	0.0000000001411	0.5	0.00000000005059	0.00000000009307									
19	7.0	31.38	0.0000000003451	0.5	0.00000000012157	0.00000000020783									
20	7.5	33.03	0.0000000007868	0.5	0.00000000028298	0.00000000049052									
21	8.0	34.65	0.0000000017672	0.5	0.00000000063851	0.00000000112913									
22	8.5	36.29	0.0000000040990	0.5	0.00000000144405	0.00000000257318									
23	9.0	37.84	0.0000000086949	0.5	0.00000000317597	0.00000000574915									
24	9.5	39.32	0.0000000182097	0.5	0.00000000672615	0.00000001247530									
25	10.0	40.77	0.0000000375697	0.5	0.00000001394485	0.00000002642015									
26	...														

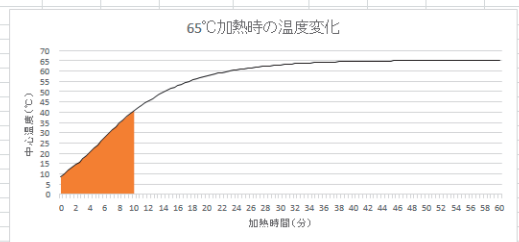


図6. 鹿肉検体の加熱時中心温度測定記録様式の例.

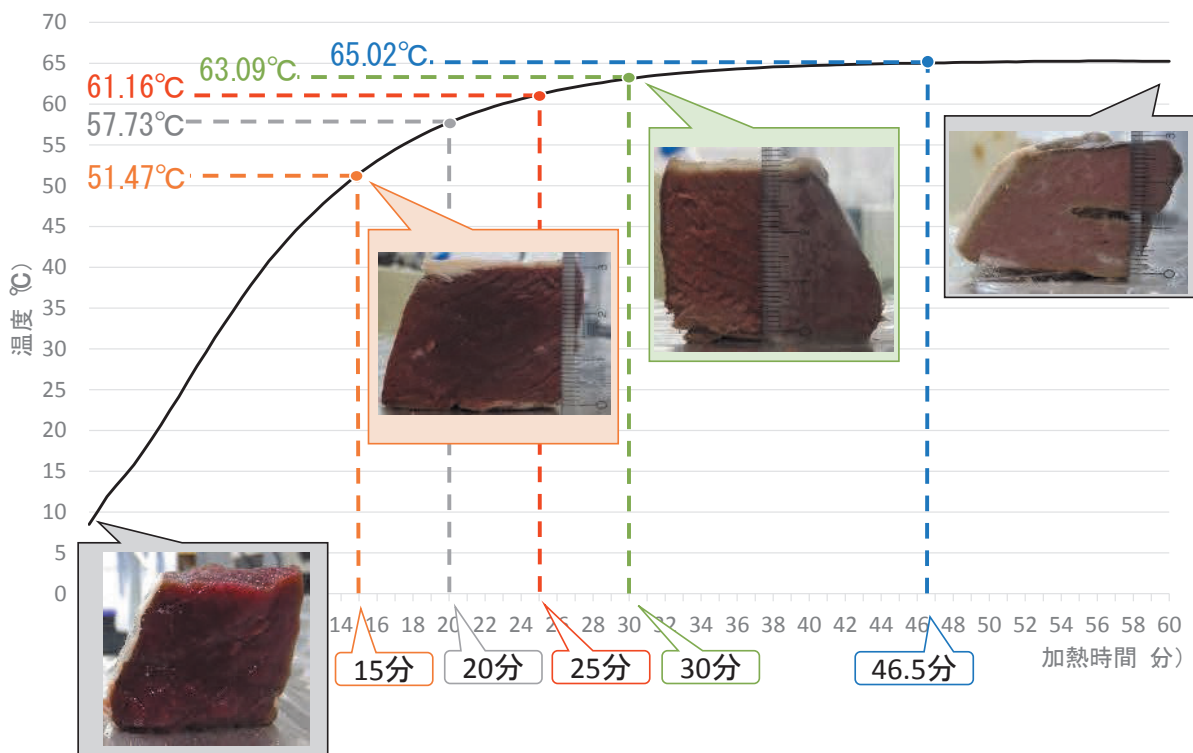


図7. 65°Cに設定したスチームコンベクションオーブンで加熱調理した鹿肉検体の割面色調および検体中心温度の経時的挙動.

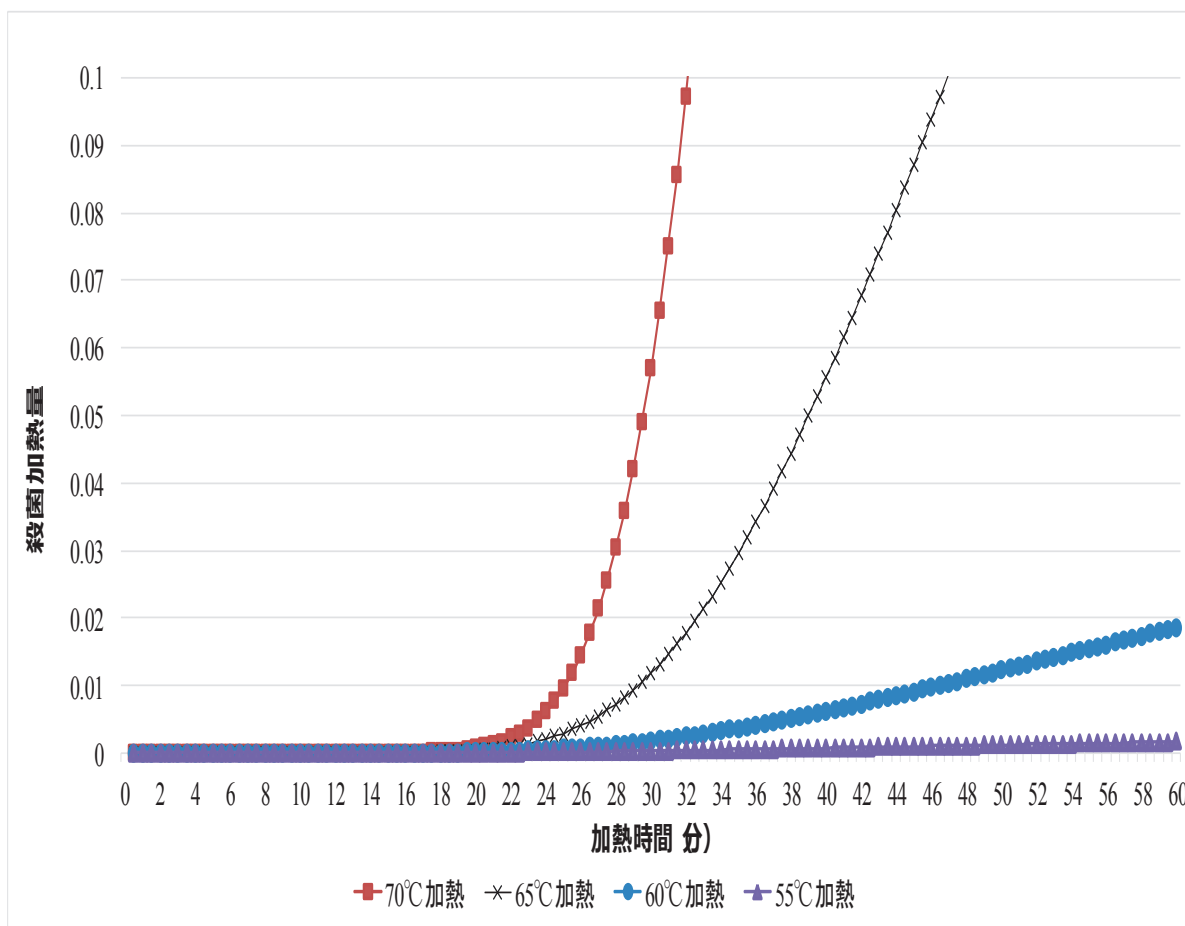


図 8. 異なる設定温度条件でスチームコンベクションオーブンを用いて加熱調理した際の鹿モモ肉検体中心部における殺菌加熱量の推移。

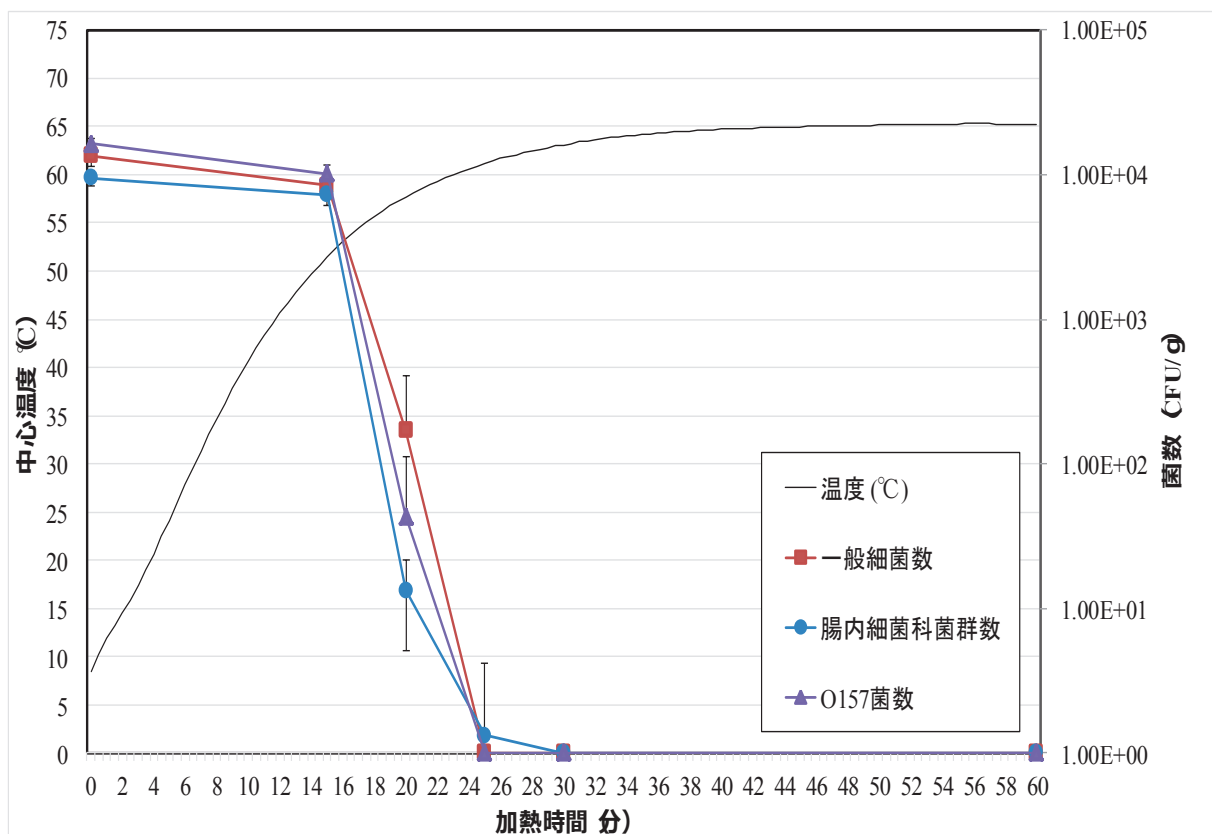


図9. 65℃設定下での加熱調理を行った際の鹿モモ肉検体中心温度ならびに STEC O157 の経時挙動.

平成 28 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

ジビエ加工食品における微生物汚染実態に関する研究

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
研究分担者	壁谷英則	日本大学生物資源科学部獣医学科
研究協力者	池田徹也	北海道衛生研究所感染症部細菌グループ
研究協力者	青木佳代	滋賀県衛生科学センター食品細菌係
研究協力者	渡邊真弘	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：昨年度実施した市販流通鹿肉・猪肉製品を対象とする病原微生物汚染実態に関する研究では、1 検体より志賀毒素産生性大腸菌（STEC）が検出された。鹿肉及び猪肉は狩猟期が限られているため、より保蔵性の高い加工製品も多くの事業者によって開発が進み、流通が促進される傾向にある。こうした背景を鑑み、本年度は、当該製品計 105 検体を対象とした病原微生物の検出状況に関する検討を行った。主要病原細菌と目される STEC 及びサルモネラ属菌は全ての検体で陰性であったが、鹿生ハム 2 検体からはリステリア・モノサイトゲネスが基準値以下ながらも検出された。また、衛生指標菌の分布成績として、大腸菌群または大腸菌について陽性を示した検体はそれぞれ 12 検体（11.4%）、2 検体（1.9%）であり、鹿肉燻製品や生ハム等、非加熱食肉製品であった。この他、鹿由来 STEC 株の特性として、鹿宿主への特性が高いと想定される *stx2d* 型が現在も存在すること、薬剤耐性遺伝子の保有状況は、家畜由来株に比べて低いこと等をゲノム解析により明らかにした。以上より、鹿肉・猪肉を加工して製造される流通製品の衛生実態は多様性に富み、製造加工工程における衛生管理手法の標準化が必要と思われる。

A. 研究目的

厚生労働省では、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フードチェーン全体での衛生的取扱い方法について、詳細に例示してはならず、作成を検討する上では、科学的根拠となる実態把握が必要となる。昨年度は、市販流通する鹿

肉及び猪肉製品を対象として、病原微生物及び衛生指標菌の検出状況を把握し、施設間での多様性を示した。野生鳥獣由来食肉の利活用にあたっては、これらの食肉の直接消費のほか、高い保蔵性を有する食品や、多様な嗜好性を踏まえた商品開発も推進されているところであり、実際に、ハムやソーセージ等の加熱食肉製品に加え、ジャーキーや生ハム等の非加熱喫食食品も市場に流通している状況にある。

こうした背景を鑑み、本研究では、国内において鹿肉・猪肉を原材料として市販流通される加工食肉製品を対象に、衛生指標菌及び主要病原細菌の汚染実態に関する検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 食品検体

平成28年4月から29年1月までの間に、計17の食肉加工施設にて鹿肉あるいは猪肉を主たる原材料として製造・加工されたジビエ加工食品105検体(鹿肉加工製品87検体、猪肉加工製品18検体)を入手し、以下の試験に供した。

2. 検体の前処理及び指標菌定量試験

食品検体25gを無菌的に採取し、225mLの緩衝ペプトン水(BPW, pH7.4)の入った滅菌ストマッカー袋に入れ、ホモゲナイザーを用いて懸濁液を調整した。これを原液として10倍段階希釈溶液を作成し、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、一般細菌数、大腸菌群数、大腸菌数を求めた。

3. 主要病原細菌の検出試験

指標菌定量検出用に調整した、検体懸濁液残液を37℃で18時間培養した後、1mL容の培養液より全DNA抽出を行った。これを鋳型として、志賀毒素産生性大腸菌(STEC)の産生する志賀毒素遺伝子 *stx*, およびサルモネラ属菌が共通保有す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法を定法に従い実施し、増幅の有無を確認した。

また、リステリア・モノサイトゲネスの検出に際しては、「リステリア・モノサイトゲネスの検査について」(平成26年11月28日食安発1128第2号)に記載される試験法を用いた。

4. 鹿由来 STEC 株のゲノム解析

染色体DNAを鹿由来 STEC 株より抽出し、Ion Chef/Ion PGM Sequencer を用いてドラフトゲノム配列情報を取得した。不要配列の除去および Contig 配列取得には CLC Genomic Workbench ver. 9.0 を、Annotation には RAST server を用いた。

C. 研究結果

1. 病原細菌の検出状況

供試検体については、STEC 及びサルモネラ属菌は検出されなかった。一方で、リステリア・モノサイトゲネスについては鹿生ハム製品2検体が陽性を示した(表1)。定量試験を通じ、当該検体における汚染菌数はそれぞれ10CFU/g及び8CFU/gとなり、現在の基準値を逸脱はしていない状況

を確認した。この状況を踏まえ、同一製品の異なるロットを入手し、同様に検査に供したが、何れも陰性となった。

2. 指標菌検出状況

一般細菌数については、 10^2 - 10^4 オーダー/g の検体が 56.2% (59/105) を占めたが、5 製造施設由来の 5 検体(鹿生ハム 2、鹿ジャーキー 2、生サラミ 1) からは、 10^7 オーダー/g の一般細菌数が検出された(表 2)。また、大腸菌群については、全体の 88.6% (93/105 検体) が陰性を示したが、2 施設で製造された鹿肉ジャーキーでは、 10^2 - 10^3 オーダー/g の検出を認めた(表 2)。大腸菌については、98.1% (103/105) が陰性であったものの、鹿生ハム 2 検体は陽性であった(表 2)。

3. 鹿由来 STEC 株のゲノム解析

計 5 株の鹿由来 STEC 株についてドラフトゲノム配列を取得した。取得データに基づく各株の構造遺伝子数は 5,161-5,401 であり、rRNA、tRNA 数はそれぞれ 70-79 及び 64-70 であった。志賀毒素遺伝子型については、3 株が *stx1a*、2 株が *stx2d* であった。また、薬剤耐性遺伝子については全ての株において認められなかった。

D. 考察

本研究では、鹿肉・猪肉加工製品計 105 検体を対象として、主要病原細菌の汚染実態ならびに衛生指標菌分布に関する検討を行った。病原細菌として、リステリア・モノサイトゲネスが検出された鹿生ハムについては、鹿肉に特異的な成績というよりも、生ハムという非加熱食肉製品としての性質

に基づくものと考えられる。同一施設で製造加工された別ロットの同一製品からはリステリアは検出されなかったことから、製造加工施設の持続汚染が顕れているとは考え難いが、バイオフィーム形成を生じやすい当該菌の性状から鑑みて、今後も類似する製品の微生物危害管理については特に留意すべきと考えられる。

指標菌分布成績は、施設・製品間での多様性を指し示す結果といえる。製品の別では、生ハムやジャーキー等での大腸菌・大腸菌群汚染が認められたことを受け、今後こうした製品を取り扱う製造加工施設での検証も必要な課題と考えられる。一方で、ソーセージ等の加熱調理を行った食肉製品については大腸菌・大腸菌群は全て陰性であったことから、こうした加工製品については、他家畜のものと同様、一定の安全性確保が行われている現状を把握することができた。

また、今回の供試検体からは検出されなかったものの、STEC については鹿肉での汚染も報告されており、鹿由来 STEC 株におけるゲノムデータから、鹿が保有する当該病原菌はヒトへの病態を顕す要因となりうることで改めて示された。一方で、薬剤耐性遺伝子が検出されなかった本ゲノムデータは、食肉を介した耐性菌の伝播を考える上で、野生鳥獣由来食肉が関与する割合は総じて低いと示唆される。

E. 結論

鹿肉・猪肉を主原材料とする加工食肉製品における主要病原細菌ならびに衛生指標菌汚染分布に関する検討を行った。加工前の食肉と同様、加工製品についても施設間

で衛生指標菌の分布は大きく異なっている状況を確認した。また、生ハム製品の一部からはリステリア・モノサイトゲネスが基準値を逸脱はしていないものの検出され、当該製品の製造加工工程における汚染要因の探知と改善措置の必要性が提唱された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Asakura H, Ikeda T, Yamamoto S, Kabeya H, Sugiyama H, and Takai S. Draft genome sequence of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from wild deer in Japan. *Genome announc.* 5 (9): e01455-16.

2. 学会発表

・ 森 篤志、安河内 彩、小西良子、杉山 広、五十君静信、朝倉 宏. 市販ジビエ食肉の細菌汚染実態と構成菌叢に関する検討. 日本防菌防黴学会第43回年次大会.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 鹿肉・猪肉加工製品検体における主要病原細菌の検出状況.

主要病原菌	陽性	陰性
STEC	0	105
<i>Salmonella</i> spp.	0	105
<i>L. monocytogenes</i>	2	103

表 2. 鹿肉・猪肉加工製品検体における指標菌分布.

指標菌	<10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
生菌数	19	0	22	24	13	9	13	5	0
大腸菌群数	93	0	6	6	0	0	0	0	0
大腸菌	103	1	1	0	0	0	0	0	0

検体 1g あたりの指標菌数 (CFU/g) を 1 オーダー毎に示す。

平成28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 平 健介 麻布大学 獣医学部

研究協力者 小林 直樹 麻布大学 生命・環境科学部

研究協力者 高崎 一人 (株)ファスマック

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

昨年は、鹿肉の食中毒危害物質の一つである *Sarcocystis* 属の寄生虫を対象に、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。この結果は衛生管理マニュアル作成に貢献した。本年度は、昨年度の本研究事業の成果をもとに、鹿肉に汚染が多い食中毒危害物質を選択し、それらを迅速に検出できる手法を開発した。

Sarcocystis 属は、日本シカにおいては、寄生率は非常に高く、地域によっては100%

の陽性率である。また、糞中の食中毒細菌実態調査結果では腸管出血性大腸菌のうちベロトキシン（VT）産生菌が多いことが報告されている。このことから、今年度は、*Sarcocystis* 属とVTを遺伝子レベルで迅速、簡便に検出できるLAMP クロマトグラフィーを開発した。本研究成果は、と殺処理、加工処理現場で衛生管理法として活用できる可能性が高い。

A. 研究目的

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）」を策定した。その後さらに実用化したガイドラインの策定が進んでいる。昨年度行った本研究事業の成果から、日本山梨県に生息する野生シカ肉におけるサルコシスティス属寄生虫感染は100%であった。また、食中毒細菌としての汚染として多く見られたのは、ベロ毒素（VT）産生性腸管出血性大腸菌であった¹⁾。本研究では、シカ肉の感染率の高い*Sarcocystis*属寄生虫と感染率が高いVT毒素産生腸管出血性大腸菌をターゲットにした、簡便迅速測定法を開発し、現場での衛生管理の普及に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1) 供試材料および試薬

山梨県で捕獲されたシカの横隔膜筋から精製した*Sarcocystis*属のブラジゾイドを試料として用いた。DNA抽出には、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。

LAMPクロマトグラフィーにおいては、増幅にBst PolymeraseおよびIsothermal Master Mix (ニッポンジーン社) を用い、DNAクロマトはC-PAS4 (TBA社) を用いた。

2) プライマーの決定

鹿に寄生する*Sarcocystis*を検出可能なプライマーを作成するにあたり、シカ肉に寄生する*Sarcocystis*の18S ribosomal DNA領域の塩基配列の決定を行った。「*Sarcocystis fayeri*の検査法について（生食監発0427第4号）」に従い、鹿肉よりDNA抽出およびPCRを行った。その後、増幅産物をT

Aクローニングし、シーケンス解析を行った。相同性検索は、NCBIが提供するBLASTを用いて行った。

決定した塩基配列情報から適切なプライマーのシーケンスを決定した。

VT産生性腸管出血性大腸菌の検出は、すでに報告されているstx1, stx2を検出する配列を用いた^{2,3)}。

3) LAMPクロマトグラフィー

本研究で開発した*Sarcocystis*属とstx1およびstx2のプライマーを用いて、以下の手法で行った。DNAサンプルは、鹿肉から精製した*Sarcocystis*属のブラジゾイドと、VT1およびVT2産生性腸管出血性大腸菌0-157 (NIHS_0106株) から作成した。

DNAサンプルを100倍希釈しておき、調整したPrimer Mixと調整したReaction Mixを加え、ヒートブロックにて65°C、45分間反応したあと、氷上で5分間静置し、ボルテックス&スピンドアウンをする。滅菌水を280uL添加し希釈し、調製したC-PAS MixにDNAクロマトを浸し、室温で15-20分間展開した。

それぞれの試薬の組成を以下に記した。

<Primer Mix>

100 μM F3	2 μL
100 μM B3	2 μL
100 μM FIP	8 μL
100 μM BIP	8 μL
100 μM LF	1 μL
100 μM LB	1 μL
1M Tris-HCl (pH 8.0)	2 μL
0.1M DTT	2 μL

D. W. 174 μ L

<Reaction Mix>

Enzyme Mix 10 μ L

Primer Mix 5 μ L

Temp DNA(またはサンプル) 5 μ L

<C PAS Mix>

Product DNA 1 μ L

Reaction buffer 19 μ L

C. 研究結果

1) *Sarcocystis* 属検出用プライマーの設計

昨年の研究成果から、日本シカには少なくとも4種類の*Sarcocystis* 属が寄生していることが分かっているが、それぞれの種の分子生物学的特徴は明らかにされていない。そこで、シカ肉に存在する*Sarcocystis* の18S ribosomal DNA領域の塩基配列の決定を試みた。

山梨県で捕獲された日本シカの横隔膜筋から採取した*Sarcocystis* のブラジゾイドから18S ribosomal DNA領域の増幅を行い、クローニングを行った。形質転換した大腸菌から27個のクローンを取り (C1-C27)、プラスミドDNAを精製してシーケンスを決定した (図1)。

増幅産物全長配列が決定できた11クローンについてBLASTNによる相同検索を行った結果 (表1)、4株が*Sarcocystis silva*、4株が*Sarcocystis taeniata*、2株が*Sarcocystis tarandi*の登録配列と99%以上の相同性を示した。残り1株も*Sarcocystis silva*の登録配列と97%の相同性を示し、シカに寄生する*Sarcocystis* の配列はこれまで報

告されている*Sarcocystis* 属の配列と類似していた。

そこで、プライマーを設計するにあたり、NCBIに登録されている*Sarcocystis* 属のrDNA配列データを収集した。今回決定したC5の配列をqueryとしてBLASTNを行ったところ、*Sarcocystis* 属の87種322配列がhitし、そのうちカバー率が80%以上のもの (65種140配列) をプライマー設計の材料として収集した。さらに、種同定されていない*Sarcocystis* sp. に関してもカバー率が80%以上のものが50配列あり、併せて用いた。

また、*Sarcocystis* 属特異的なプライマーを設計するため、*Sarcocystis* の近縁種のrDNAの配列も収集した。C5の配列を用いてBLASTNによる相同検索を行い、*Sarcocystis* 属を除く上位100に入るデータの中から、種名が異なる21配列を選んだ。これらの配列と、今回sequenceを決定した*Sarcocystis*の配列 (C4、C5、C9、C13、C17、C18、C27) およびデータベースに登録されている*Sarcocystis taeniata* の配列を用いて系統樹を作成した (図2)。

これらの結果から、*Sarcocystis* 属のみに共通に存在する配列を選び、プライマー配列とした。

2) LAMPクロマトグラフィー

つぎに、本研究で開発した*Sarcocystis* 属のプライマーとすでに報告されているVT産生性腸管出血性大腸菌のプライマーを用いて、それぞれのDNAサンプルを用いてLAMPクロマトグラフィーを行った。VT産生性腸管出血性大腸菌のプライマーは Dongらの報告²⁾ と、Zhaoらの報告³⁾ の2種類を使用した。

その結果、図3に示すように、明瞭なバンドが確認された。またネガティブコントロールである水に対しては、反応が認められず、これらが特異的な反応であることが明らかとなった。

D. 考察

今年度は、寄生率が極めて高いサルコシスティス属寄生虫とシカの糞便に汚染が多いVT産生性腸管出血性大腸菌の2つを迅速にかつ簡便に検出する検査法の開発を行った。検査法は、衛生管理に必要な複数の危害物質を一斉検査できることを目的としていること、抗体を用いる検査法では抗体を開発製造するまで時間がかかることから、本研究では、遺伝子検査を選択した。近年遺伝子検査も1つの温度帯のみで増幅でき、さらにクロマトグラフィーが可能なLAMP法が開発されていることから、この方法での検査法確立を試みた。

シカのサルコシスティス属寄生虫に関しては特異性の高いプライマーが開発されていないことから、日本シカの横隔膜筋から採取した*Sarcocystis* のブラジゾイドを用いて、18S ribosomal DNA領域の増幅、クローニングを行い、いくつかのコロニーを対象にその配列を明らかにした。その情報をもとに系統樹を書き、適切なプライマーの設計を行った(図1、2、表1)。

一方、VT産生性腸管出血性大腸菌を遺伝子的に検出する方法はすでに確立しており、いくつかのプライマーが報告されていることから、その中でもっとも感度よくVT遺伝子であるStx1およびStx2を検出できる系を検討した。

これらのプライマーを用いて、それぞれ

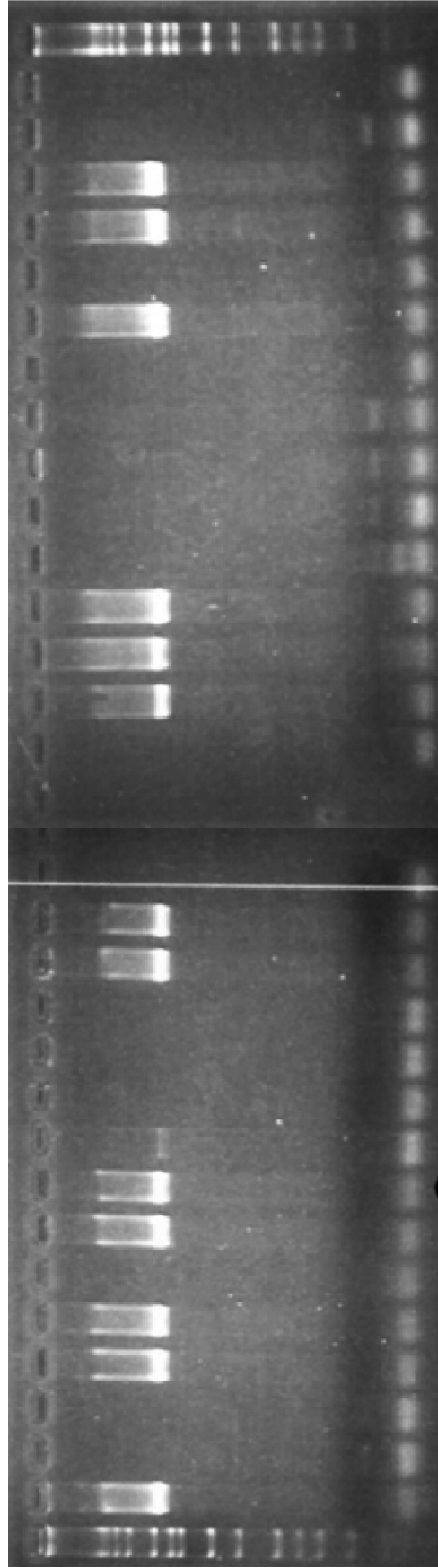
のDNAサンプルを対象にLAMPクロマトグラフィーを行ったところ、明確なバンドが検出できた(図3)。今後は鹿肉を用いて反応感度を検討し、実用化していく予定である。

F. 参考文献

1. 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 平成27年度研究報告書(研究代表者 高井 伸二)
2. Dong HJ, Cho AR, Hahn TW, Cho S., Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification assay to detect a higa toxin-producing *Escherichia coli* in cattle. *J.Vet.Sci.*,15,317-325 (2014)
- 3 Zhao X1, Li Y, Wang L, You L, Xu Z, Li L, He X, Liu Y, Wang J, Yang L., Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. *Mol.Biol.Rep.*, 37 (5):2183-8.(2010)

G. 研究発表

- 1) 澤谷守、 本田三緒子、 平健介、 清水秀樹、 朝倉宏、 小林直樹、 小西良子：鹿肉に寄生するサルコシスティスの保蔵・加工要因に対する感受性：第37回 日本食品微生物学会学術総会、東京、2016年9月



M C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10C11C12 C13C14 C16 C17C18 C19 C20 C21 C22C23 C24 C25 C26 C27C28

M

M:Marker

図1. 形質転換後の大腸菌からとれたプラスミドDNA

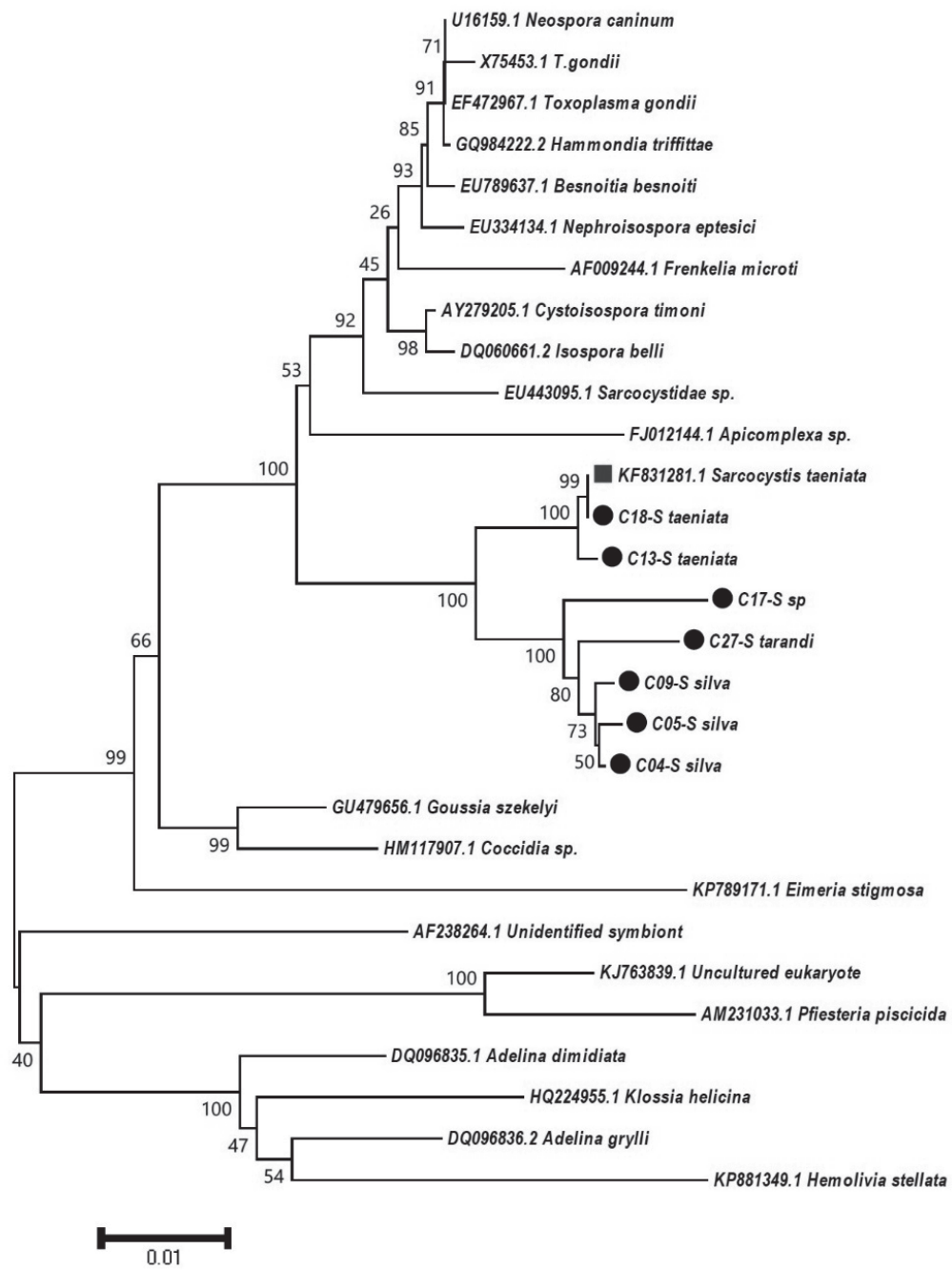


図2. 山梨県生息シカに寄生する*Sarcocystis*属および*Sarcocystis* 近縁種の18s ribosomal DNA 系統樹



primer	
1	D-stx1* ¹
2	DW
3	D-stx2* ¹
4	DW
5	Z-stx1* ²
6	DW
7	Z-stx2* ²
8	DW
9	SARC
10	DW
11	SARC
12	DW

SARCO検出位
 stx2検出位置
 stx1検出位置

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

図3. DNA クロマトグラフィーによる*Sarcocystis*属、VT産生性腸管出血性大腸菌の検出

*1. ref. 2)のプライマー

*2. Ref 3)のプライマー

表 1. BLASTNによる相同検索結果

C01	species	Seq D	E-value	Identity	C13	species	Seq D	E-value	Identity
	Sarcocystis tarandi	EF056018.1	0	906/916 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831290.1	0	1853/1862 (99%)
	Sarcocystis tarandi	EF056017.1	0	891/898 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831293.1	0	1852/1862 (99%)
	Sarcocystis silva	JN256132.1	0	901/922 (98%)		Sarcocystis taenata	KF831283.1	0	1852/1862 (99%)
	Sarcocystis tarandi	GQ250969.1	0	874/884 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831280.1	0	1851/1862 (99%)
Sarcocystis silva	EU282016.1	0	900/922 (98%)	Sarcocystis taenata	KF831278.1	0	1849/1862 (99%)		
C04	species	Seq D	E-value	Identity	C14	species	Seq D	E-value	Identity
	Sarcocystis silva	JN256132.1	0	1816/1835 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831293.1	0	603/606 (99%)
	Sarcocystis silva	EU282016.1	0	1804/1824 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831292.1	0	603/606 (99%)
	Sarcocystis tarandi	EF056018.1	0	1800/1822 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831291.1	0	603/606 (99%)
	Sarcocystis rangiferi	EF056016.1	0	1799/1823 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831290.1	0	603/606 (99%)
Sarcocystis tarandi	EF056017.1	0	1784/1804 (99%)	Sarcocystis taenata	KF831289.1	0	603/606 (99%)		
C05	species	Seq D	E-value	Identity	C14	species	Seq D	E-value	Identity
	Sarcocystis silva	JN256132.1	0	1821/1854 (98%)		Sarcocystis taenata	KU753889.1	0	534/542 (99%)
	Sarcocystis silva	EU282016.1	0	1809/1843 (98%)		Sarcocystis taenata	KU753887.1	0	534/542 (99%)
	Sarcocystis rangiferi	EF056016.1	0	1803/1842 (98%)		Sarcocystis taenata	KF831290.1	0	534/542 (99%)
	Sarcocystis tarandi	EF056018.1	0	1802/1846 (98%)		Sarcocystis taenata	KF831287.1	0	533/541 (99%)
Sarcocystis tarandi	EF056017.1	0	1785/1828 (98%)	Sarcocystis taenata	KF831285.1	0	533/541 (99%)		
C07	species	Seq D	E-value	Identity	C17	species	Seq D	E-value	Identity
	Sarcocystis silva	JN256132.1	0	1201/1214 (99%)		Sarcocystis silva	JN256132.1	0	1779/1838 (97%)
	Sarcocystis truncata	GQ251021.1	0	1179/1185 (99%)		Sarcocystis sp.	JN256136.1	0	1784/1848 (97%)
	Sarcocystis rangiferi	EF056016.1	0	1190/1205 (99%)		Sarcocystis sp.	JN256137.1	0	1784/1850 (96%)
	Sarcocystis silva	EU282016.1	0	1189/1203 (99%)		Sarcocystis sp.	JN256134.1	0	1782/1848 (96%)
Sarcocystis silva	JN226125.1	0	1185/1199 (99%)	Sarcocystis silva	EU282016.1	0	1767/1827 (97%)		
C09	species	Seq D	E-value	Identity	C18	species	Seq D	E-value	Identity
	Sarcocystis silva	JN256132.1	0	1659/1678 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831281.1	0	1864/1875 (99%)
	Sarcocystis rangiferi	EF056016.1	0	1655/1675 (99%)		Sarcocystis taenata	KU753887.1	0	1859/1871 (99%)
	Sarcocystis silva	EU282016.1	0	1658/1678 (99%)		Sarcocystis taenata	KF831288.1	0	1862/1875 (99%)
	Sarcocystis rangiferi	EF056015.1	0	1649/1675 (98%)		Sarcocystis taenata	KU753890.1	0	1858/1871 (99%)
Sarcocystis sp.	AB257161.1	0	1625/1638 (99%)	Sarcocystis taenata	KU753889.1	0	1858/1871 (99%)		
C27	species	Seq D	E-value	Identity	C27	species	Seq D	E-value	Identity
	Sarcocystis tarandi	EF056017.1	0	1560/1571 (99%)		Sarcocystis tarandi	EF056018.1	0	1556/1571 (99%)
	Sarcocystis tarandi	EF056018.1	0	1556/1571 (99%)		Sarcocystis ebnigata	GQ251019.1	0	1548/1558 (99%)
	Sarcocystis ebnigata	GQ251019.1	0	1548/1558 (99%)		Sarcocystis ebnigata	GQ251017.1	0	1547/1558 (99%)
	Sarcocystis ebnigata	GQ251017.1	0	1547/1558 (99%)		Sarcocystis silva	JN256132.1	0	1562/1582 (99%)
Sarcocystis silva	JN256132.1	0	1562/1582 (99%)						



Draft Genome Sequence of Five Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Wild Deer in Japan

Hiroshi Asakura,^a Tetsuya Ikeda,^b Shiori Yamamoto,^a Hidenori Kabeya,^c Hiromu Sugiyama,^d Shinji Takai^e

Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan^a; Department of Infectious Diseases, Hokkaido Prefectural Institute of Public Health, Hokkaido, Japan^b; Department of Veterinary Public Health, Nihon University, Kanagawa, Japan^c; Division of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan^d; Laboratory of Animal Hygiene, Kitasato University, Aomori, Japan^e

ABSTRACT Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is one of the major food-borne pathogens. Having observed the wide distribution of this pathogen in wild deer, we report here the draft genome sequence of five STEC strains isolated from wild deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Hokkaido, Japan.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) represents a major issue for public health because of its capability to cause large outbreaks and the severity of the associated illnesses (1). Epidemiological data have mounted evidence for the distribution of STEC in farm animals (2), but wildlife animals such as wild deer and other cervids and birds also carry STEC (3–5). Recently, increased trends for the consumption of game meats, mainly consisting of wild deer and boar meats, in Japan (6) have made it necessary to elucidate virulence properties of STEC from these wildlife animals. As wild deer has been recognized as one of the major reservoirs (7), we obtained STEC strains 11226, 11229, 11247, 15821, and 16309 from feces of wild deer (*Cervus nippon yesoensis*) inhabiting Hokkaido, Japan, between 2011 and 2016. Genomic DNA of the five strains were sequenced by single-end sequencing with an Ion Torrent PGM sequencer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), resulting in an average coverage of 139×. Raw reads were trimmed and *de novo* assembled using CLC Genomics Workbench v 9.0 (Qiagen, Hilden, Germany). The parameters for trimming were as follows: ambiguous limit, 2; quality limit, 0.05; number of 5'-terminal nucleotides, 20; number of 3'-terminal nucleotides, 5. The parameters for the *de novo* assembly were as follows: mapping mode, create simple contig sequences (fast); bubble size, 50; word size, 21; minimum contig length, 1,000 bp; perform scaffolding, no; autodetect paired distances, yes.

The draft genomes of the five STEC strains were assembled into 250, 246, 282, 238, and 135 contigs with an accumulated length ranging from 5,248,909 to 5,404,906 bp (N_{50} , 140,330 bp on average) and an average G+C content of 45.5% to 50.7%. The genome was annotated by the RAST server (8). Annotation of these assemblies identified 5,161 to 5,401 coding sequences (CDSs), 70 to 79 rRNAs, and 64 to 70 tRNAs.

Their sequence types (ST) and serotypes were also identified as follows: ST32/O145:NM (11226), ST446/OUT:HUT (11229), ST11/O157:H7 (11247), ST32/O145:NM (15821), and ST5597/OUT:HUT (16309), by multilocus sequence type (MLST) 1.8 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) and slide agglutination testing.

Three genomes (strains 11226, 15821, and 16309) contained *stx1a*, and two strains, 11229 and 11247, contained *stx2d*, which showed 100% similarity in the nucleotide sequences to those from STEC previously isolated from wild deer (3). Other representative virulence genes, *eae* and *ehxA*, were present in three genomes (11226, 11247, and 15821). Since *eae*-negative STEC also cause human illness (9), we could not exclude the

Received 1 November 2016 Accepted 26 December 2016 Published 2 March 2017

Citation Asakura H, Ikeda T, Yamamoto S, Kabeya H, Sugiyama H, Takai S. 2017. Draft genome sequence of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from wild deer in Japan. Genome Announc 5: e01455-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01455-16>.

Copyright © 2017 Asakura et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Hiroshi Asakura, hasakura@nihs.go.jp.

possibility for their potential to cause human infection. Additionally, four genomes except for strain 11229 contained *astA*, which is associated with the development of diarrhea (10). The data provided can aid in future efforts to identify the source of infection. Further accumulation of genomic data of the deer-originating STEC and their use for evolutionary studies would also improve our understandings of the host or geographic adaptation of this pathogen.

Accession number(s). This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the GenBank accession numbers [BDLI01000000](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2) (11226), [BDLJ01000000](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2) (11229), [BDLK01000000](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2) (11247), [BDLL01000000](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2) (15821), and [BDLM01000000](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2) (16309). The versions described in this paper are the first versions, BDLI01000000 (11226), BDLJ01000000 (11229), BDLK01000000 (11247), BDLL01000000 (15821), and BDLM01000000 (16309).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) (H27-shokuhin-ippan-011) and a Grant-in-Aid of Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) (16K08040).

REFERENCES

1. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365:1073–1086. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71144-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2).
2. Persad AK, LeJeune JT. 2014. Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2:EHEC-0027-2014.
3. Asakura H, Makino S, Shirahata T, Tsukamoto T, Kurazono H, Ikeda T, Takeshi K. 1998. Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. *Microbiol Immunol* 42: 815–822. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1998.tb02356.x>.
4. Franklin AB, Vercauteren KC, Maguire H, Cichon MK, Fischer JW, Lavelle MJ, Powell A, Root JJ, Scallan E. 2013. Wild ungulates as disseminators of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in urban areas. *PLoS One* 8:e81512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081512>.
5. Makino S, Kobori H, Asakura H, Watarai M, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K, Tsukamoto T. 2000. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiol Infect* 125:55–61. <https://doi.org/10.1017/S0950268899004100>.
6. Japan Ministry of Environments. 2014. Protection and control of wild birds and mammals and hunting management act. (<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H14/H14HO088.html>) Accessed: 15 October 2016.
7. Miko A, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N, Krause G, Beutin L. 2009. Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wild-life meat as potential pathogens for humans. *Appl Environ Microbiol* 75:6462–6470. <https://doi.org/10.1128/AEM.00904-09>.
8. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formisano K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
9. Lorenz SC, Kotewicz ML, Hoffmann M, Gonzalez-Escalona N, Fischer M, Kase JA. 2016. Complete genome sequences of four enterohemolysin-positive (*ehxA*) enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Genome Announc* 4(5):e00846-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00846-16>.
10. Weiglmeier PR, Rösch P, Berkner H. 2010. Cure and curse: *E. coli* heat-stable enterotoxin and its receptor guanylyl cyclase c. *Toxins* 2:2213–2229. <https://doi.org/10.3390/toxins2092213>.