

平成 28 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業  
畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究  
( H28-食品-一般-005 )

総括研究報告書

研究代表者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

近年日本国内では、これまで生食されなかった畜産食品が生食されるなど、食文化が多様化してきている。しかしながら、畜産食品は微生物や寄生虫等による汚染を完全に防ぐことが難しく、生食或いは加熱不十分な喫食による健康被害の発生リスクは高い。畜産食品の生食による食中毒の発生を防ぐために必要な行政措置が取られてきたが、生食用の牛肝臓を安全に提供する技術を望む声も聞かれる。本研究では、牛肝臓における微生物汚染実態を明らかにすると共に、汚染細菌を低減させる非加熱殺菌法の検討を行った。

今年度の汚染実態調査は、平成 28 年 6 月～9 月(夏季)及び同年 12 月～29 年 2 月(冬季)に、5 自治体の食肉センターでとさつ・解体された計 51 頭の肉用牛の肝臓及び胆汁について実施した。牛肝臓表面、胆管内胆汁、肝実質(右葉、左葉各 2 部位)の計 6 部位について衛生指標菌の定量試験を行ったところ、3 施設由来の計 25 検体については実質から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌は検出されなかった。残り 2 施設のうち、1 施設で冬季に採材された 5 検体の実質では同様に各種指標菌は陰性であった。別の 1 施設由来の全 15 検体は、季節の別を問わずそれぞれ 15 検体、15 検体、7 検体が腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の陽性を示した。2 施設由来検体の実質内細菌汚染は、左葉に比べ右葉で高い傾向を示し、腸内細菌科菌群の最大菌数は  $1.5 \times 10^5$  cfu/g であった。一部施設由来の検体は、採材後の輸送時間が肝実質での細菌汚染動態に影響を及ぼした可能性が考えられた。3 施設における胆汁中の腸内細菌科菌群陽性数は、10 検体中 1 検体、15 検体中 2 検体、9 検体中 2 検体が陽性となり、最大数値は  $1.2 \times 10^3$  cfu/mL と実質に比べ低い定性・定量成績となり、実質汚染指標部位としての有用性は低いと目された。一方、近年食品衛生管理の検証にも利用されている菌叢解析を通じ、胆汁・実質構成菌叢の合致性は、実質汚染の程度を図る上での指標となりうる可能性があると考えられた。

非加熱殺菌法の検討は、放射線照射と高圧処理を検討した。放射線照射では、牛肝臓に  $2 \times 10^6$  cfu/g の *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を接種し、9.65～10.2 kGy の範囲のガンマ線を照射したところ、脱気試料は、5 検体中 2 検体、含

気試料は、5 検体中 1 検体で *Salmonella* が非検出となったが、残りの検体では *Salmonella* が検出された。先行研究で得た生残曲線に 95% 予測信頼区間を設けた結果を基に曝露線量を検討することは妥当と考えられた。非加熱殺菌法のひとつである高圧殺菌法を用いて、牛肝臓中の食中毒原因菌の低減手法について検討した。高圧処理前の保管温度、高圧処理時の温度及び高圧処理後の保管温度について複数の条件を組み合わせ、300 MPa 5 分間を 2 回反復する処理により、牛肝臓に接種したサルモネラ属菌は 1.26 ~ 2.15 log の、病原大腸菌は 1.41 ~ 2.22 log の低減を示した。サルモネラ属菌は高圧処理前に検体を 20 で保管した場合に、菌数低減効果が高くなる傾向がみられた。一方病原大腸菌では、処理前後の冷凍保管による菌数低減効果は見られなかった。サルモネラ、病原大腸菌のいずれにおいても、高圧処理後の選択分離培地上の集落数が非選択培地上よりも著しく低く、高圧処理により損傷菌が発生していると思われた。高圧処理による肝臓の肉質変化は、処理圧力に比例していたが、処理前に検体を冷凍保存することにより、一部変化を軽減しうる可能性が示された。以上の結果から、牛肝臓中の高圧処理を行う際に、処理前後の冷凍保管を行うことで、ある程度サルモネラ属菌の菌数低減効果を高めることや肉質の変化を軽減しうることを示された。一方で、今回認められた菌数低減効果は最大で 2.15 log であり、高圧処理単独での処理によって牛肝臓内の菌数を生食用として提供が可能なレベルにコントロールすることは困難と思われ、今後他の非加熱殺菌法との組み合わせによる処理条件の検討が必要と思われた。

次年度以降は、汚染実態調査については更に研究協力機関を確保し、検体数を増やすことにより、正常かつ衛生的な取り扱いを受けた牛肝臓の実質内細菌汚染の定量を推し進め、当該最大値を把握することを目標とする。放射線照射については、今年度得られた予測曲線の境界を挟んで、照射試験を行い、 $10^5 \sim 10^7$  cfu/g オーダーの *Salmonella* を不活性化させる線量を明確にして行く。高圧処理については、損傷菌を発生させず、確実に一定レベルの低減を達成しうる処理条件を確立し、その上で他の非加熱殺菌法との組み合わせることにより、最終的に必要なレベルの菌数低減を達成しうるか、検討を行う予定である。

|        |               |              |              |
|--------|---------------|--------------|--------------|
| 分担研究者： | 佐々木 貴正        | 国立医薬品食品衛生研究所 |              |
| 朝倉 宏   | 国立医薬品食品衛生研究所  | 山本 詩織        | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 等々力 節子 | 国立研究開発法人 農研機構 | 渡邊 真弘        | 国立医薬品食品衛生研究所 |

研究協力者：

方波見 佐知子 青森県十和田食肉衛生検査所  
 石井 昌史 青森県十和田食肉衛生検査所  
 佐々木 亨 青森県十和田食肉衛生検査所  
 相馬 要 千葉県東総食肉衛生検査所  
 水田 勲 千葉県東総食肉衛生検査所  
 久本 千絵 兵庫県食肉衛生検査センター  
 福水 章二 兵庫県食肉衛生検査センター  
 近森 和加 高知市食肉衛生検査所  
 藤川 洋一郎 高知市食肉衛生検査所  
 大谷 公美 福岡県食肉衛生検査所  
 臂 博美 福岡県食肉衛生検査所  
 川瀬 遵 島根県食肉衛生検査所  
 白木 豊 岐阜県食肉衛生検査所  
 品川 邦汎 岩手大学  
 川崎 晋 国立研究開発法人 農研機構  
 鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所  
 吉田 麻利江 国立医薬品食品衛生研究所

#### A. 研究目的

平成 23 年に我が国で発生した、牛肉の生食による腸管出血性大腸菌による集団食中毒事例をきっかけとして、食肉及び内臓肉を生食することの危険性が広く再認識された。食の安全を確保するため、生食用牛肉の加工基準の設

定及び牛肝臓の生食禁止という行政措置が実施されたが、その一方で、牛肝臓の生食の安全性を確保することにより、規制の解除を求める声も聞かれている。本研究では、日本国内における牛肝臓中の腸内細菌科菌群等の汚染実態調査やその最大値を把握することを目的として、全国の食肉処理施設に協力を求め、汚染実態とその季節変動、と畜解体処理手法等に関する調査解析を行った。更に、畜産食品を汚染する食中毒菌を生食可能なレベルまで低減することを目的として、放射線照射及び高圧殺菌について検討を行った。

#### B. 研究方法

##### (1) 汚染実態調査

今年度は、5 自治体 (A ~ E) の協力を得て、以下の試験を実施した。

##### 1. 牛肝臓検体の条件等

本研究における検体としては、(i) 牛個体は、概ね 36 ヶ月齢以下の未経産雌または去勢雄の交雑種または和種であること(ii)自治体管内あるいは隣接管内で生産され、とちく当日あるいは前日に輸送されたものであること( ) 生体検査において異常を認めない個体であること( )内臓検査において異常を認めず、被膜の大きな損傷がないこと(v)胆嚢に損傷がなく、胆汁が十分に満たされていること(肉眼的に胆汁の漏出がないことが望ましい)の条件を満たすものとした。

採材にあたっては、牛と体の腹側正中線を切開した後、胆嚢を保持した肝臓を可能な範囲で衛生的に取り出し、

胆嚢と総胆管の間を外側から絹糸等で結紮した。その後、速やかに 10 以下の温度帯で検査室に搬送し、次項の手順に従って、部位毎の採材を行った。各施設での採材手順、搬入条件(温度、時間)等についてはその都度記録した。

## 2. 検体調整等

牛肝臓は、以下の手順で可能な限り無菌的に部位別に切り分け、検体とした(分担報告書図 1~5)。

### 1) 採材方法等について

検体入手後は、速やかに胆嚢管を結紮し、10 以下で保存を行い、個体識別番号を記録した。複数検体を処理する場合は、1 頭分ごとにビニール袋に入れる等して、交差汚染の防止に努めた。

### 2) 採材部位及び前処理

肝臓左葉表面 1ヶ所(検体部位番号 1)、胆汁(検体部位番号 2)、実質左葉 2箇所(検体部位番号 3,4)、実質右葉 2箇所(検体部位番号 5,6)の計 6 部位を無菌的に採材した。

### 表面拭き取り(検体部位番号 1)

肝臓全体が載る大きさのバット等にラップ等を敷き、肝臓・胆嚢検体を分担報告書図 1 のように配置した。左葉中心部に 10 cm x 10 cm の拭き取り枠をあて、拭き取り検査キットを用い拭き取り操作を行った。採取検体は試験に供する迄、10 以下又は氷上で保存・輸送した。検体を試験に供するまでの時間は概ね 3 時間以内とした。表面拭き取りについては、肝臓摘出直後に実施することも可とした。

### 胆汁(検体部位番号 2)

19.5 G の滅菌済注射針と 10 mL 容の滅菌済ディスプレイ注射筒を用い、予め消毒した胆嚢表面に穿刺して胆汁を回収した(分担報告書図 2)。胆汁は 15 mL の滅菌遠心管へ移し、10 °C 以下または氷上で保存して、概ね 3 時間以内に試験に供した。

### 肝臓実質(検体部位番号 3~6)

消毒済の刃物を用いて左葉を切り離し、左葉中央部を切り出した後、切り出した左葉外側(検体番号3)及び左葉内側(検体番号4)を切り出し、それぞれ滅菌シャーレに取り分けた(分担報告書図3)。その後、上下反転させ、右葉を切り離した。左葉と同様に右葉中央部を切り分け、右葉内側(検体番号5)及び右葉外側(検体番号6)を切り出し、滅菌シャーレに取り分けた。

消毒済のハサミ・ピンセットを用いて検体番号3~6の表面(シャーレに接する底面以外の5面)から 1 cm を目安に切り出した(分担報告書図5)。その後、底面より 1 cm 上部を切り取り、新しい滅菌シャーレに移した。同ブロックの重量を 10 g となるよう調整し、滅菌ストマッカー袋に 40 mL の緩衝ペプトン水と共に加えた。1 分間ストマッキング処理を行い、検体懸濁原液を調製した。

## 3. 衛生指標菌の定量試験

9 mL 容の滅菌 PBS を用いて各検体の 10 倍階段希釈列を作成した。その後、各 1 mL の試験溶液を、3 種類のペトリフィルム(RAC プレート、EB プレート、EC プレート)(3M)に接種し、指示書に従って培養・計数を行うこと

で、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数を求めた。

#### 4. DNA 抽出

上記 2. で調製した検体懸濁溶液 0.5 mL より、Cica Geneus® Total DNA prep kit ( 関東化学 ) を用いて、DNA 抽出を行った。

#### 5. STEC 及びサルモネラ属菌の定性試験

上記 2. で調製した懸濁溶液残液を 37 ℃ にて 18 時間培養後、培養液 1 mL を 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに分注し、DNA 抽出液を作成した。これを鋳型として、サルモネラ属菌及び STEC の *stx* 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。

#### 6. 菌叢解析

上記 4. の 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 ) を用いて、増幅産物を精製した。同精製物を定量後、30 検体を上限として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。

#### (2) 放射線照射による微生物除去

##### 1. 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は、東京芝浦食肉処理場にて屠殺直後に凍結した牛肝臓塊 ( 約 5.3 kg ) を用いた。これらは購入後、-80 ℃ で保存した。試料は 25 g の塊となるよう無菌的に切り分け、各々ガスバリア性の袋に移した後、-80 ℃ で冷凍保存した。

##### 2. 供試菌株

供試菌は、*Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を用いた。

供試菌を Trypticase Soy Broth (TSB; Difco) にて 35 ℃ 一昼夜静置培養した後、遠心分離 ( 4000 x g, 10 分間 ) により菌体を収集、培地成分を除去した。おのおの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 $10^9$  cfu/mL となるように調整、これを供試菌液として以降の試験に用いた。

##### 3. ガンマ線照射と線量分布確認

ガンマ線照射は、(一財)放射線利用振興協会に委託し、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構、高崎量子応用研究所のガンマ線照射施設を用いて行った。照射時の温度は、冷凍(ドライアイス下：-80 ℃)とし、照射中の温度を一定に保つため、肝臓試料の背面にドライアイス当て、全体を発砲スチロールの容器に入れ、前面から照

射を行った。線量率は約 2.5 kGy/h であった。

吸収線量の分布は、殺菌試験に用いたものと同型の肝臓試料を模擬試料とし、試料内部と表面に装着したアラニンペレット (ES200-2106:ブルッカーバイオスピン社製) とともに、常温照射を行った。照射後アラニンペレットの信号を ESR 装置 (Bruker EMX-Plus) で測定して決定した。検量線は英国の National Physical Laboratory の標準アラニンペレットで作成した。

#### 4. 牛肝臓のガンマ線殺菌効果確認試験

菌体の接種は、自然解凍後した 25 g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液 100  $\mu$ L を注射針により注入することで行った。菌体濃度は終濃度で、 $10^5 \sim 10^7$  cfu/g 程度となるように調製した。菌体接種後の試料は、直ちに、ガスバリア袋 (PTS 袋, 三菱ガス化学製、PB180250P 90 $\times$ 120 mm) を用いて含気あるいは真空包装を行った。含気条件では、ヘッドスペースに空気を残し、脱気条件では、真空包装機を用いて、袋内の空気を抜いてヒートシールした。包装後の検体は、-80 の冷凍庫内で 2 時間以上放置して温度を一定にした後、ガンマ線照射(目標線量 10 kGy)で照射した。

#### 5. 標的微生物の検出

ガンマ線照射後の検体は、照射した後、検体に滅菌緩衝ペプトン水を加えて 10 倍乳剤とした後、35 で一昼夜培

養した。培養した菌液は標準寒天平板および VRBG 平板 (Oxoid) に一白金耳を各線し、35 で一昼夜培養した。出現した集落は、それぞれ釣菌し、イムノクロマト法による *Salmonella* 同定キット (Singlepath *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

#### (3) 高圧処理による牛肝臓中の食中毒原因菌不活化の検討

##### 1. 供試菌株

*Salmonella* Typhimurium LT2 株、*Salmonella enterica* JCM1651 株、*Salmonella enterica* JCM1652 株、enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) HP1001 株、enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) WHO1 株、enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) EDL933 株及び enteroaggregative *E. coli* (EAEC) PEZ 株を用いた。サルモネラ菌株及び病原性大腸菌株は 80 に保存し、Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地に植え、単一集落を BHI 液体培地に接種して 37 で 20 から 24 時間静置培養したものを高圧処理試験及び牛肝臓への添加試験に供した。

##### 2. 検体

菌液を用いた高圧処理試験では、1 の培養菌液を高圧処理用袋に分注後、袋をシールしたのち、滅菌蒸留水を入れた外袋を更にシールして二重に密封した。

高圧処理を行う牛肝臓は、芝浦臓器株

式会社から購入し、冷蔵状態で運搬した。接種試験用の検体は 10 g 片に切断し、滅菌した高圧処理用袋に分包後、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を更にシールして二重に密封した。硬度及び色彩を測定する肝臓検体は 25 g 片に切断し、高圧処理前の硬度、色調を計測後、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

菌液を用いた高圧処理試験では、二重包装済みの菌液検体を、Dr. CHEF（分担報告書図 1：神戸製鋼株式会社）を用いて 250 MPa 及び 500 MPa の高圧処理を行った。

牛肝臓中に接種した病原菌に対する殺菌効果の測定のための高圧処理は、300 MPa、5 分を 2 回反復する条件で行った。処理温度は 20℃、4℃ 又は室温に設定した。高圧処理前の保管温度は、20℃ 又は室温に、高圧処理後の保管を行う場合の温度は 20℃ 又は 80℃ に設定した。

高圧処理による牛肝臓の硬度及び色調の変化を測定するため、菌を接種しない肝臓検体に 250 MPa、300 MPa 及び 400 MPa の圧力で 5 分間処理する条件で行った。処理温度は 20℃ 又は 4℃ に設定した。高圧処理前の保管温度は、80℃ から 4℃ の範囲に設定した。

### 4. 菌数測定

菌液を用いた高圧処理試験では、高圧処理後の包装を無菌的に開封し、菌液を滅菌生理食塩水中で 10 倍階段希釈して、各希釈列の各 100 µl をサルモネラ属菌では BHI 寒天平板及び CHROMagar サルモネラ平板に、病原大腸菌では BHI 寒天平板及び TBX 寒天平板に塗布後、37℃ で好気培養を行い、24 及び 48 時間後に定型集落の計数を行った。牛肝臓中に接種したサルモネラ属菌に対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を 9 倍量の滅菌生理食塩水中でストマッカー処理して 10 倍乳剤を作成し、各 100 µl 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、24 及び 48 時間後に定型集落の計数を行った。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。病原性大腸菌の殺菌効果の測定は、サルモネラ属菌と同様に 10 倍乳剤を作成し、BHI 寒天平板及び TBX 寒天平板に塗布後、37℃ で好気培養を行い、24 及び 48 時間後に定型集落の計数を行った。

### 5. 硬度及び色調

高圧処理前及び処理後の肝臓検体について、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。

## C. 研究結果

### (1) 汚染実態調査

5 自治体 (A ~ E) の協力を得て、各食肉センターでとちく解体された計

51頭の牛肝臓検体を採取した。採取した全51頭由来肝臓のうち、2頭分の肝臓については、胆管炎と診断されたため、異常を認めるものと判断されたが、細菌汚染実態を比較検討するにあたっての参考検体とした。

## 1. STEC 及びサルモネラ属菌の検出状況

PCR スクリーニング試験の結果として、全ての供試検体（51頭×6部位＝306検体）は、陰性を示した。

## 2. 衛生指標菌の検出状況

### 1) 部位別成績比較（分担報告書表 1、2 及び図 6）

#### (i) 一般細菌

表面拭き取り検体では、49 検体中 43 検体が陽性を示し（陽性率 87.8 %）、全体での平均値は  $1.8 \times 10^4$  cfu/100 cm<sup>2</sup>（最小値：検出限界以下、最大値： $8.4 \times 10^4$  cfu/100 cm<sup>2</sup>）であった。

胆汁検体については、計 10 検体が陽性を示し（陽性率 20.4 %）、最大値は  $4.7 \times 10^5$  cfu/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、30 検体（陽性率 30.6%）および 40 検体（同 40.8%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 $1.7 \times 10^7$  cfu/g、陰性検体も含めた全体の平均値は  $2.0 \times 10^5$  cfu/g であった。

#### (ii) 腸内細菌科菌群

表面拭き取り検体では、19 検体から腸内細菌科菌群が検出され（38.8 %）、最大値は  $2.5 \times 10^5$  cfu/100 cm<sup>2</sup> であった。

胆汁検体については、5 検体が陽性となった（陽性率 10.2 %）が、最大値は  $1.2 \times 10^3$  cfu/mL に留まった。

実質左葉・右葉検体では、26 検体（陽性率 26.5%）および 33 検体（同 33.7%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 $1.5 \times 10^5$  cfu/g であった。

#### (iii) 大腸菌群

表面拭き取り検体では、12 検体から大腸菌群が検出され（24.5 %）、最大値は  $7.4 \times 10^3$  cfu/100 cm<sup>2</sup> であった。

胆汁検体では、4 検体が陽性となり（陽性率 8.2 %）、最大値は  $2.8 \times 10^5$  cfu/mL と腸内細菌科菌群よりも高値を示した。

実質左葉・右葉検体では、23 検体（陽性率 23.5 %）および 31 検体（同 31.6 %）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 $6.9 \times 10^6$  cfu/g であった。

#### (iv) 大腸菌

大腸菌陽性を示した表面拭き取り検体は 9 検体（陽性率 18.4 %）あり、最大値は  $1.3 \times 10^2$  cfu/100cm<sup>2</sup> であった。胆汁検体は全てが検出限界以下であった。

実質左葉・右葉検体では、9 検体（陽性率 9.2 %）および 12 検体（同 12.2 %）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 $1.7 \times 10^5$  cfu/g であった。

### 2) 施設別の成績比較（分担報告書表 2 及び図 6-8）

#### (i) 自治体 A

自治体 A では夏季 5 検体、冬季 5 検

体を検討した。当該施設における採材から試験開始までの所要時間は1時間30分～2時間25分であり、清浄なプラスチックコンテナを用いて採材し、表面拭き取り並びに外科用糸を用いた胆嚢根部の結紮を行った後、大量の氷を入れた発泡スチロール箱内で10以下を保ちつつ搬送された。当該施設での牛肝臓検査合格率は約7割、自治体管内あるいは隣接管内からの生体搬入率は約8～9割であった。

当該施設由来検体については、季節間での明確な差異は何れの指標菌についても認めなかったほか、実質からは僅かに1検体（右葉）が、一般細菌陽性を示すにとどまった。

#### (ii) 自治体 B

自治体 B では夏季5検体、冬季10検体の協力を得た。当該自治体の協力内容として、今年度は採材のみとしていたため、採材後は冷媒を入れた発泡スチロール箱を用いて数時間冷却保管後、試験に供した。そのため、採材後に氷を用いた急速冷却処理等を行うことはできなかった。当該施設での牛肝臓検査合格率は約8割、自治体管内あるいは隣接管内からの生体搬入率は約5～6割であった。

当該検体実質における腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の陽性率は、それぞれ48.0%（47/98）、49.0%（48/98）、19.4%（19/98）と他施設での検討成績に比べて高率であり（分担報告書表2）大腸菌陽性となった肝臓は計7頭分にのぼった（個体当りの

陽性率として、46.7%）。また、実質左・右葉間では、左葉から検出される菌数が全体に低い傾向であった（分担報告書図7）。また、季節別では、夏季平均に比べ、冬季平均は増加傾向にあった（分担報告書図7）。

#### (iii) 自治体 C

自治体 C では夏季5検体、冬季5検体の協力を得た。当該施設における採材から試験開始までの所要時間は約15分であり、清浄な金属バットに受け取った後、ビニール袋に入れ、冷媒を入れた発泡スチロール箱で検査室へ搬送された。当該施設での牛肝臓検査合格率は約7～8割、自治体管内あるいは隣接管内からの生体搬入率は約4～5割であった。

当該自治体では、夏季・冬季間での成績に顕著な差異が認められ、夏季の検出成績としては、自治体 B とほぼ同等の陽性率を示したものの、冬季には表面拭き取りを除く検体で全ての指標菌が検出限界以下となった（分担報告書図8）。本自治体で冬季に採取した1検体については胆管炎との診断がなされた（参考データとしての取扱い）が、同検体では、一般細菌、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が胆嚢内胆汁を除く全部位より検出された（分担報告書図9）。実質からの腸内細菌科菌群検出率は夏季では60%（12/20検体）であったのに対し、冬季は陰性（0/16）となった。

#### (iv) 自治体 D および E

自治体 D では夏季 5 検体、冬季 5 検体の協力を得た。当該施設における採材から試験開始までの所要時間は 5 分～25 分であり、清浄なプラスチックコンテナ中で冷却搬送された。当該施設での牛肝臓検査合格率は約 7 割、自治体管内あるいは隣接管内からの生体搬入率は約 5 割であった。

自治体 E については、冬季からの研究協力体制となり、計 6 頭分の牛肝臓を検討対象とした。採材から試験開始までの所要時間は約 20 分～30 分であり、清浄なステンレスバット上に摘出された牛肝臓を受け取った後、クーラーボックス中で冷却・搬送された。当該施設での牛肝臓検査合格率は約 4～5 割、自治体管内あるいは隣接管内からの生体搬入率は約 3～4 割であった。なお、自治体 E については、胆汁採取後、胆汁の実質への拡散を抑制する意味合いから、胆嚢を切除し、輸送・供試していた。

自治体 D 及び E の細菌試験成績としては、表面拭き取り検体を除き、全ての指標菌が検出限界以下となった。なお、自治体 D において、冬季に採材した 1 検体については、検体確保直後に胆管炎との診断がなされ（参考データとしての取り扱い）、一般細菌、腸内細菌科菌群、大腸菌群が実質より検出された（分担報告書図 9）。

### 3. 構成菌叢

#### 1) 部位別比較（分担報告書図 10-12）

検討施設のうち、最も高いまたは低い指標菌値を認めた自治体 B 及び自治

体 A 由来検体を対象に、構成菌叢の部位別比較解析を行った。

自治体 B 由来検体中での部位別比較を通じ、実質では *Arthrobacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Brevundimonas* 属等が主たる優勢菌叢であったのに対し、胆汁では *Microbacterium* 属が 60 % 以上を占め、実質とは大きく異なる構成を示すことが明らかとなった（分担報告書図 10）。また、表面拭き取り検体の構成菌叢は胆汁・実質いずれとも大きく異なり、*Klebsiella* 属、*Clostridium* 属が全体の 60 % 以上を占めた。

供試対象の衛生指標菌をほぼ認めなかった自治体 A 由来検体の肝臓実質の優勢菌叢は、自治体 B とほぼ同様であり、*Arthrobacter* 属、*Sphingomonas* 属、*Pseudomonas* 属、*Lactococcus* 属、*Brevundimonas* 属が全体の約 63% を占めた（分担報告書図 11）。また、胆汁の主たる構成菌叢としては、*Arthrobacter* 属、*Sphingomonas* 属、*Pseudomonas* 属、*Acinetobacter* 属等が挙げられ、これらの菌属による占有率は約 49% であった（分担報告書図 10）。このほか、自治体 A 由来の胆汁では、*Campylobacter* 属の占有率が相対的に高い傾向にあった（分担報告書図 11）。

以上より、衛生指標菌検出レベルの低い自治体 A 由来検体では、胆汁と実質の優勢構成菌叢には重複する部分が多い一方、高い指標菌検出を認めた自治体 B 由来検体では相対的に胆汁と実質間での構成菌叢に相違を認めた。優

勢菌叢の一つである *Brevundimonas* 属の胆汁占有率は実質に比べて施設に関わらず低い傾向を示し、胆汁を介さない伝播経路の介在も示唆された。

## 2)胆管炎検体における原因菌と分布性

胆管炎を呈した参考検体については、指標菌検出状況を鑑み、胆汁及び実質左または右葉のいずれかを選定し、同施設の検査合格検体との間で比較検証した。

指標菌数成績として、自治体 C で認められた軽度の胆管炎を呈した検体では胆汁から腸内細菌科菌群、大腸菌(群)は検出されなかったが、当該部位構成菌叢の約 5.4 %は大腸菌であり、実質からは、より高い占有率(約 15.6 %)で当該菌が検出された(分担報告書図 12 左)。また、自治体 D 由来の胆管炎検体では、全ての部位で大腸菌分離培養成績が陰性となったが、菌叢成績では大腸菌が極めて優勢(実質右葉構成菌叢の約 82.3 %)であるとの知見が得られた(分担報告書図 12 右)。この他、両疾病検体では、正常検体に比べて、胆汁中の *Caulobacter* 占有率低下が共通事項として認められた(分担報告書図 12)。

## (2)放射線照射

### 1. 照射試料の配置と線量分布

牛肝臓試料(25 g, 厚さ約 14 mm)の中心に、アラニンペレットを封入し、ガスバリア袋で包装後、発砲スチロール容器(外径(436 mm(縦)×276 mm(横)×136 mm(奥行き))、内径(400

mm(縦)×240 mm(横)×100 mm(奥行き))の蓋の裏側に密着するように 10 配置し、背面からドライアイス当てることを想定してクッションで押さえた(分担報告書図 1)。これを模擬試料として肝臓試料の距離方向の中心位置を、分担報告書図 2 に示すように、照射室内の線量率の基準線とあわせて設置した。

模擬試料の照射による線量分布の検討は A: 試料箱を分担報告書図 1、2 に示すような縦長に設置し、試料を反転させずに一方向から照射、B: 試料箱を横長に設置して、照射時間の半分の時間で、同位置に置いて試料の前後を 180 度回転させ両面から照射(その際の試料の高さの中心位置はコバルト線源の中心位置(22.5 cm)に合わせた)の 2 通りの方法で実施した。

A、B、2 種類の照射方法で、約 10 kGy を目標として実施した際の、各位置の牛肝臓の中心および背面での吸収線量(kGy)を分担報告書図 3 に示した。A に示した縦長方向での配置では、コバルト線源中心(高さ 22.5 cm)から上下方向に離れるにつれ、線量が低下し、肝臓中心の線量測定した 10 個の試料の線量の最大/最小比は、1.08 であった。また、試料の向きを変えない一方向からの照射では、線源に対して、後方となる試料表面の線量は、肝臓の中心位置に対して、90~95%に減少していた。そこで、殺菌効果検討における線量分布の幅をより小さくするため、分担報告書図 3 の B のように試料箱を横長方向に設置し、さらに距離方

向の線量のばらつきを緩和するため、照射時間が半分経過したところで、肝臓試料を反転させて、両面照射を行った。その結果、肝臓中心における 10 個の試料の線量の最大/最小比は 1.05 に減少し、1 つの試料内の線量はほぼ均一で、表面に対する中心の線量は、最も離れている場合でも、98 %に減少する程度であった。10 個の試料の中心部および試料表面も含めた全体の分布は、9.65 ~ 10.2 kGy の範囲であり、最大/最小線量比は 1.06 であった。

## 2. 牛肝臓中における *Salmonella* の死滅効果

牛肝臓に接種した  $10^6$  cfu/g オーダーの *Salmonella* をドライアイス下、10 kGy までの線量で低減させることができるか否かを検討した。接種菌数を  $2 \times 10^6$  cfu/g ( $6.3 \log$  cfu/g) とし、試料箱の上段に脱気試料 5 検体、下段に含気試料 5 検体を取り付け、前項で検討した B (横置き、両面照射) の方法で模擬試料を照射したときと同等の配置、時間で 10 kGy を目標として照射を行った。分担報告書図 4 に、各照射位置での検出結果を示す。脱気試料は、5 検体中 2 検体、含気試料は、5 検体中 1 検体で *Salmonella* が非検出となった。なお、この時の照射では、幅約 47 cm の試料箱を板上線源の正面に平行に設置して左右方向にほぼ均一の線量を得ている。参考として、この箱の両脇に同様に箱蓋裏に同型の試料を取り付けた試料箱を設置して照射したときの各試料の線量は、試料中心で、

9.8~12.3 kGy と広範な分布となった。これは、照射室内の線量分布ライン(曲線)と箱内試料の試料位置(直線)が合わず、同一線量分布の曲線より、線源に近い部分の線量が高くなったためである。この線量分布域に、 $2 \times 10^5$  cfu/g ( $5.3 \log$  cfu/g) の *Salmonella* 接種試料 10 個において、ガンマ線照射を行った結果は、10 検体すべてで不検出となった。また、 $2 \times 10^7$  cfu/g ( $7.3 \log$  cfu/g) 接種試料では、線量の高い位置 (模擬試料の中心線量、12.3、11.8、11.7 kGy) において、3 検体が *Salmonella* 非検出となった。

先行研究において、 $10^8$  cfu/g オーダーの *Salmonella* を接種した脱気試料を、ドライアイス下 5 kGy まで照射して、生残菌数を計数し、その対数を直線回帰して得た生残曲線と、その 95 % 予測信頼区間のプロットを分担報告書図 5 に示す。この生残曲線に 95 % 予測信頼区間を考慮して、10 kGy の線量で死滅が期待できる菌量は、 $6.2 \sim 7.5 \log$  cfu/g、また  $6.0 \log$  cfu/g の菌数低減が可能な予測値の範囲は、8.0 ~ 9.8 kGy と予測される。

### (3) 高圧処理

#### 1. サルモネラ属菌と病原大腸菌の菌株間での高圧耐性の相違

サルモネラ属菌 3 菌株と、病原大腸菌 4 菌株について、250 MPa 及び 500 MPa の高圧処理後の生残性を測定することにより、高圧耐性の比較を行ったところ、サルモネラ属菌では JCM1652 株が 250 MPa 及び 500 MPa

における生残性が最も高い結果を示した(分担報告書図2)。病原大腸菌では、EHEC EDL933株が250 MPa及び500 MPaにおける生残性が最も高い結果を示した。EHEC EDL933株は他の株と比べ、500 MPa処理後の非選択培地上の集落数と選択培地上の集落数の差が少なく、検討した株の中で損傷菌となりにくい傾向が最も強かった。以上の結果より、牛肝臓への接種試験にはもっとも強い高圧耐性を示した *S. enterica* JCM1652株と EHEC EDL933株を用いた。

## 2. 高圧処理前後の保管温度がサルモネラ属菌及び病原大腸菌の菌数低減に及ぼす影響

高圧処理前の保管温度、高圧処理時の温度及び高圧処理後の保管温度について複数の条件を組み合わせ、300 MPa、5分2回反復の高圧処理を行った結果の菌数を分担報告書表1-2及び2に示した。牛肝臓に接種したサルモネラ属菌は1.26~2.15logの、病原大腸菌は1.41~2.22 logの低減を示した。サルモネラ属菌は高圧処理前に検体を20℃で保管した場合に、菌数低減効果が高くなる傾向がみられた。一方病原大腸菌では、処理前後の冷凍保管による菌数低減効果は見られなかった。サルモネラ属菌、病原大腸菌のいずれにおいても、高圧処理後の選択分離培地上の集落数は非選択培地上よりも著しく低く、高圧処理により損傷菌が発生していると思われた。

## 3. 高圧処理が牛肝臓の色調と硬さに及ぼす影響

高圧処理による牛肝臓の肉色及び硬さの変化を測定した結果を表2に、写真を分担報告書図3に示した。処理前に4℃で保管し、高圧処理を4℃で行った場合(条件1-3)、硬さを示す最大破断点の加重は、圧力に比例して高くなる傾向を示した。処理前に検体を20℃で保管し、4℃で高圧処理を行った場合は(条件4-6)、いずれの圧力でも硬さが同程度増す傾向が見られた。一方、処理前に検体を80℃で保管し、20℃で高圧処理を行った場合(条件7-9)、250 MPaの処理では検体の硬さに大きな変化はなく、400 MPaの処理後の検体が柔らかくなる傾向が示された。牛肝臓の肉色については、処理前に4℃で保管し、高圧処理を4℃で行った場合(条件1-3)、明るさを示すL値、赤みを示すa値及び黄みを示すb値共に、圧力に比例して高くなる傾向を示した。処理前に検体を20℃で保管し、4℃で高圧処理を行った場合は(条件4-6)、250 MPa及び300 MPaにおいてL値、a値及びb値共に、4℃保管時よりも数値が高くなる傾向が見られた。一方、処理前に検体を80℃で保管し、20℃で高圧処理を行った場合、250 MPa(条件7)の処理ではL値の低下が見られ、300 MPa(条件8)では条件5と同様の色調を示した。一方、400 MPa(条件9)では条件3及び条件6と比べ、色調変化が少ない傾向が示された。また、高圧処理後の牛肝臓は、圧力に比例して切断端が丸みを帯びる形

態変化が見られた(分担報告書図3-1~4)。高圧処理を行わない場合の、冷蔵及び冷凍保存による肝臓の肉質変化は、特に認められなかった(分担報告書図3-5~7)。

#### D. 考察

汚染実態調査においては、今年度は5自治体の協力を得て、食肉センターでとさつ・解体された直後に獣医師の監視指導の下、衛生的に取り出した牛肝臓の実質等における細菌汚染実態を把握することを目的として、細菌学的・分子生物学的検討を行った。

施設別細菌汚染成績として、肝臓実質から腸内細菌科菌群を認めた検体は、全5施設中2施設で採材された検体のみであり、残り3施設由来検体では胆管炎症例を除き、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がいずれも陰性を示した。腸内細菌科菌群陽性を示した自治体B由来検体については、採材から数時間の輸送を経て、試験に供さざるを得ない状況にあった。このような輸送中には物理的・化学的暴露を受けることに加え、検体内部温度の管理も徹底し難いため、胆汁の実質内拡散や実質・胆汁内での細菌増殖も懸念される。次年度、自治体B由来検体については、採材後速やかに検査可能な体制で調整しており、本年度成績との比較を通じ、上述の仮説を裏付けることは可能と思われる。また、自治体C由来検体の検出菌数は夏季・冬季間で顕著な差異を認められたが、実質を細切するにあたっては、両季節間で異なる資材を用いてい

たことが明らかとなっており、その影響を加味して来年度以降は、ディスプレイタイプのレーザー等を協力自治体に提供し、条件の更なる統一化を図ることで、その検証を行いたい。また、自治体Bと同様、自治体C由来検体についても、輸送にあたっては氷ではなく、冷媒を用いており、輸送中の温度管理の徹底が細菌増殖に及ぼす影響を評価する必要もあろう。その検証には、輸送中の検体表面及び内部温度の変動を測定すること、更には牛肝臓実質を用いた添加回収試験の成績を取ること等が有用と思われる。

本年度認められた肝臓実質における腸内細菌科菌群等の最大値及びその近傍の値は自治体B由来検体で多く認められており、衛生的な採材以外にも、適切かつ速やかな検体温度管理と加工処理が肝臓実質の細菌汚染低減を図る上で実効性のある対処法とも考えられる。今後は各施設での衛生管理状況に関する情報の詳細な収集・解析が必要かつ有用と考えられる。一方で、3施設由来の牛肝臓実質から腸内細菌科菌群が検出されなかった成績は、生体(に近い)状態の当該検体中に腸内細菌科菌群が存在するか否かを見定める上での貴重な情報となろう。結論を得るためには、検体数や施設数を増やすことに加え、サンプリングプランに関する検討も行うことが求められよう。

細菌汚染実態を評価するにあたり、本研究では衛生指標菌を用いた細菌試験に加え、細菌叢比較解析を通じた検討を併用した。NGSを用いた菌叢解析

手法は、食品の製造加工等における衛生管理にも有用であるとの考えが近年浸透している。構成菌叢の成績は生菌・死菌を区別することは難しいが、本研究での主たる検討対象部位である肝臓実質における細菌汚染を評価する上では、細菌移行媒体としての胆汁の寄与度を推定する1手法として有用と思われる。また、疾病排除の観点からも、胆管炎を呈する参考検体の要因として大腸菌との推定を得ることができた。分離培養成績から当該検体は大腸菌陰性であったが、胆汁酸等の物理的影響あるいは生体側の免疫生物学的影響を受けたための相違と目される。更なる検証を行うためにも、疾病牛由来肝臓を含め、より多くの検体を対象とした検討が今後も必要と思われる。

放射線照射については、先行研究での、 $10^8$  cfu/g オーダーの *Salmonella* を接種した脱気試料を、ドライアイス下 5 kGy まで照射して、生残菌数を計数し、その対数を直線回帰して得た生残曲線と、その 95 % 予測信頼区間のプロットから、10 kGy の線量で死滅が期待できる菌量は、6.2 ~ 7.5 log cfu/g、また 6.0 log cfu/g の菌数低減が可能な予測値の範囲は、8.0 ~ 9.8 kGy と予測された。

今回の実験の条件、線量 9.65 ~ 10.2 kGy、接種菌数 6.3 log cfu/g において、非検出の検体と検出の検体が混在する結果はほぼ妥当なものと推測された。今後、さらに、この予測曲線の境界を挟んで、照射試験を行い、 $10^5 \sim 10^7$  cfu/g オーダーの *Salmonella* を不活性化

させる線量を、明確にして行く必要がある。なお、 $10^5 \sim 10^7$  cfu/g オーダーの *Salmonella* を死滅させる線量の研究結果を踏まえ、流通を念頭に置いた試料の形態による殺菌効果の検証も必要である。

高圧処理においては、牛肝臓中に接種したサルモネラ属菌及び病原大腸菌の高圧処理による不活化を検討した。菌株間の高圧耐性の差異を検討したところ、サルモネラ属菌では JCM1652 株が 250 MPa の高圧処理で、0.288 log の低減のみを示し、JCM1651 株の 1.78 log、LT2 株の 2.59 log と比較して強い高圧耐性を示した。一方で、LT2 株では 500 MPa 処理後に選択培地上での集落形成が見られたことから、他の菌株よりも高い圧力下での損傷菌になりにくい菌株であると思われた。したがって、今回実施した低減効果の検討以外に、損傷菌出現状況等の検討を行う際には、別途目的に合った菌株の選定を行う必要があると思われた。

今年度の本研究では、高圧処理前の保管温度、高圧処理時の温度及び高圧処理後の保管温度について複数の条件を組み合わせて検討することにより、より高い殺菌効果が得られる条件を模索した。しかしながら、サルモネラ属菌で高圧処理前に検体を 20 で保管した場合に、若干菌数低減効果が高くなる傾向がみられたものの、病原大腸菌では影響は見られなかった。また、今回認められた菌数低減効果は最大で 2.15 log であり、高圧処理単独での処理によって牛肝臓内の菌数を生食用とし

て提供が可能なレベルに低減することは困難と思われた。今後、損傷菌の出現状況を踏まえ確実に一定レベルの低減を達成しうる処理条件を確立し、その上で他の非加熱殺菌法との組み合わせることにより、最終的に必要なレベルの菌数低減を達成しうるか、検討すべきであると思われた。

#### E. 結論

牛肝臓における細菌汚染分布状況を計5自治体の協力を得て検討した。施設や季節の別による差異が明確に認められ、その要因として、採材から供試までの輸送・保存方法あるいは胆嚢結紮の程度等が関与していると推察された。来年度以降には、更なる検体数、施設数を増やし、その要因の解明を行うと共に、衛生的取り扱いを行った際の肝臓実質内での細菌数を把握したい。

放射線照射においては、牛肝臓に  $2 \times 10^6$  cfu/g の *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を接種し、9.65 ~ 10.2 kGy の範囲のガンマ線を照射したところ、脱気試料は、5 検体中 2 検体、含気試料は、5 検体中 1 検体で *Salmonella* が非検出となったが、残りの検体では *Salmonella* が検出された。先行研究で得た生残曲線に 95 % 予測信頼区間を設けた結果を基に線量を検討することは妥当と考えられた。

高圧処理においては、牛肝臓に人工的に添加したサルモネラ属菌及び病原大腸菌の高圧処理及びその前後の保管温度による不活化効果を検討したところ、300 MPa で 5 分を 2 回反復する処

理により、サルモネラ属菌、病原大腸菌共に 2log の菌数低減が可能であった。サルモネラ属菌では処理前後に冷凍保存することにより、更に 1log の菌数低減が可能であったが、病原大腸菌においては冷凍保存の効果は見られなかった。一方、牛肝臓の肉質についても、高圧処理前の冷凍保存により色調や硬さの変化を一部軽減しうることを示された。高圧処理のみで生食用としての提供可能なレベルへの菌数低減は難しく、今後他の非加熱殺菌法との組み合わせによる検討が必要と思われた。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

講演・研修会等

なし

#### H. 知的財産権の出願，登録状況

特になし