

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）
「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」

分担研究報告書

牛肝臓等における細菌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 |
| 研究協力者 | 佐々木貴正 | 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 | 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 | 方波見佐知子 | 青森県十和田食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 石井昌史 | 青森県十和田食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 佐々木 亨 | 青森県十和田食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 相馬 要 | 千葉県東総食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 水田 勲 | 千葉県東総食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 久本千絵 | 兵庫県食肉衛生検査センター |
| 研究協力者 | 福水草二 | 兵庫県食肉衛生検査センター |
| 研究協力者 | 近森和加 | 高知市食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 藤川洋一郎 | 高知市食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 大谷公美 | 福岡県食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 臂 博美 | 福岡県食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 川瀬 遵 | 島根県食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 白木 豊 | 岐阜県食肉衛生検査所 |
| 研究協力者 | 品川邦汎 | 岩手大学 |

研究要旨：牛肝臓における細菌汚染部位及びその局在性等に関する知見を収集することを主目的として、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(自治体A～E)でとさつ・解体された計51頭の肉用牛から、胆嚢を安定的に保持した状態で肝臓を可能な限り衛生的に取り出し、試験に供することとした。このうち、自治体C・Dの施設において冬季に採材された計2検体は胆管炎を呈しており、通常の検査合格検体とは区別した。牛肝臓表面、胆管内胆汁、肝実質(右葉、左葉各2部位)の計6部位を対象とした衛生指標菌の定量試験を通じ、3自治体(A, D, E)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自治体(B, C)のうち、自治体Cの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。自治体B由来の全15検体の実質からは、季節を問わず、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がそれぞれ100%(15/15)、100%(15/15)、46.7%(7/15)と高率に検出された。自治体B・C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 1.5×10^5 CFU/gであった。自治体B由来検体は、採材から数時間後に試験に供しており、来年度は採材後速やかに試験に供することで、採材後の輸送工程が肝実質での細菌汚染動態に及ぼす影響を検討する予定である。また、胆管炎を呈した2検体の実質内腸内細菌科菌群の最大菌数は、 5.0×10^5 CFU/gであり、正常(検査合格)検体に比べ高値を示した。胆汁からの腸内細菌科菌群陽性検体数は、自治体A由来検体が10検体中1検体、自治体B由来検体が15検体中2検体、自治体C由来検体が9検体中2検体で陽性となり、最大数値は 1.2×10^3 CFU/mLである等、実質に比べ低い定性・定量成績となり、実質汚染の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・実質の優勢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。次年度以降、自治体への更なる協力を呼びかけ、検体数確保に努めることで正常かつ衛生的取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、当該最大値を求めていきたい。

A. 研究目的

牛肝臓の非加熱形態での喫食については2011年に発生した生食用牛肉を原因食品とする腸管出血性大腸菌集団食中毒事件を受け、牛肉および牛内臓肉に関する細菌汚染調査等が進められ、牛肝臓の実質内より腸管出血性大腸菌が検出されたとの報告があったことから、2012年7月に牛肝臓を生食用として提供・販売することが禁止されたことは記憶に新しい。

カンピロバクター食中毒事例の発生動向としては、こうした措置を経た後、現在に至るまで、牛肉・牛内臓肉を原因食品とする当該食中毒事例の大幅な低減が図られており、こうした施策は食中毒発生予防の観点から有効な手立てであったと考えられる。その一方で、経済活動として牛内臓肉等を取り扱う事業者、あるいはその喫食を望む消費者も一定数存在しており、牛肝臓の生食提供措置の解除を目的として、これまでも様々な観点から、牛肝臓実質における細菌汚染低減に関する研究がなされてきた。

こうした検討を行う際には、細菌汚染低減目標値の設定が必要不可欠であり、そのためには、牛肝臓実質における細菌汚染実態を精査し、部位、季節性、衛生管理手法等の多様性を考慮に入れつつ、最適かつ応用可能な対策を講じる必要があると思われる。牛のとちく・解体を行う食肉センター等については全国に多数存在しており、そ

の施設規模、構造、管理運営基準等には一定の基準はあるが、多様性も含んでいる。先行研究においては、単独施設での検討成績が挙げられ、季節性や部位別の汚染状況に関する知見が集積されてきたところである。その一方で、施設間での多様性等を含めた見解を得るには至っておらず、その成績創出が期待されてきた。

こうした背景を踏まえ、本研究では、採材対象を提示した上で複数の施設(自治体)の協力を求め、とさつ・解体直後に通常の検査工程とは異なる方法で、可能な限り衛生的に採材した牛肝臓を対象に衛生指標菌の定量試験および主要病原細菌である志賀毒素産生性大腸菌(STEC)ならびにサルモネラ属菌の定性試験を実施することとした。また、細菌学的検討に併せ、NGSを用いた菌叢比較解析を行い、実質への細菌汚染経路等に関する考察を行ったので、報告する。

B. 研究方法

本研究では、計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、以下の条件を満たすものとした。

(i) 採材対象とする牛個体は、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) 当該個体は、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。

(iii) 生体検査において異常を認めない個体であること。

(iv) 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）。

肝臓の採材にあたっては、食肉センターでとちくされた牛と体より、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縛り、胆汁の漏出を制御するように努めた。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

搬送された牛肝臓については、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（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、胆汁の漏出防止に努めた。以後の作業に着手する迄の間は、10℃以下で保存を行い、個体識別番号を記録した。複数検体を同日に処理する場合には、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。以下に各部位の採材方法を述べる。

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やまな板等にラップ等を敷き、肝臓・胆嚢検体を図1のように配置した。左葉中心部に10cm x 10cmの拭き取り枠をあて、拭き取り検査キットを用いて、指示書に従って拭き取り操作を行う。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）

19.5Gの滅菌済注射針を10mL容の滅菌済デスポ注射筒に装着し、予め表面を70%エタノールで消毒した胆嚢表面に穿刺し、10mL以上の胆汁を回収した（図2）。回収した胆汁は15mLの滅菌遠心管（A-2等のラベルを行う）へ移し替え、試験に供するまで10℃以下または氷上で保存し、概ね3時間以内に試験に供することとした。

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とする）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（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。なお、切り出す

ブロックの大きさの目安としては、少なくとも各辺5cm以上とした。

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（図5）。この際、ハサミ及びピンセットは1面切ることにより、滅菌水洗浄及び70 %エタノールによる消毒を行うこととした。その後、底面より1cm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計測しながら、10g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、検体懸濁原液を調整した。

3. 衛生指標菌の定量試験

衛生指標菌の定量にあたっては、9mL 容の滅菌 PBS を用いて各検体の 10 倍階段希釈液を作成した。その後、各 1mL 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. で調整した検体懸濁溶液 0.5mL 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 100µl 滅菌蒸留水を加え

て、95℃にて 5 分間加熱し、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。

C. 結果

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 (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%)、陰性検体も含めた全体の平均値は 1.8×10^4 CFU/100cm² (最小値: 検出限界以下、最大値: 8.4×10^4 CFU/100 cm²) 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 4.7×10^5 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、それぞれ 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、 1.7×10^7 CFU/g、陰性検体も含めた全体の平均値は 2.0×10^5 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 2.5×10^5 CFU/100cm² 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 1.2×10^3 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、 1.5×10^5 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 7.4×10^3 CFU/100cm² 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 2.8×10^5 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、 6.9×10^6 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計 9 検体 (陽性率 18.4%) あり、最大値は 1.3×10^2 CFU/100cm² 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、 1.7×10^5 CFU/g であった。

2) 施設別の成績比較 (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 検体について検討いただいた。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、表面拭き取りなら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庫内温度として 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 検体について採材協力を得た。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砲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値であり(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(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(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、冷媒を入れた発砲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(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(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（図 9）。

3. 構成菌叢

1) 部位別比較（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（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（図 10）。

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（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（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（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（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（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（図 12）。

D. 考察

本研究では、計 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的刺激等の暴露を受けることの他、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したが、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、ディスポーザブルタイプのレ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も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る。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。

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。

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

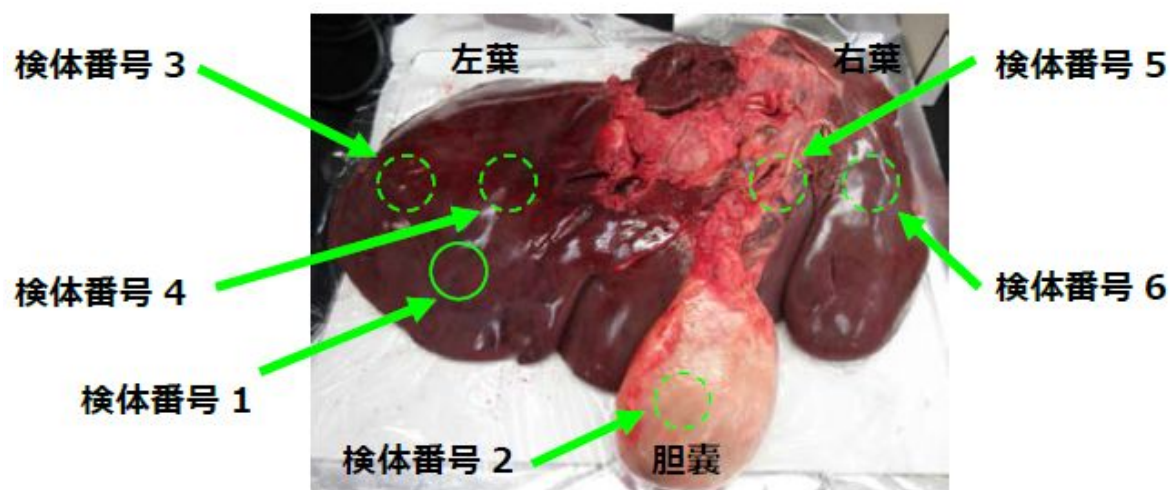
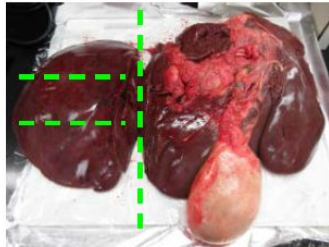


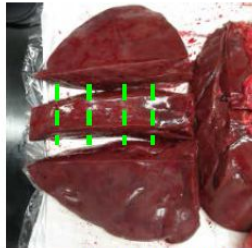
図1. 採材部位



図2. 胆嚢内胆汁の採材



左葉の切り離し

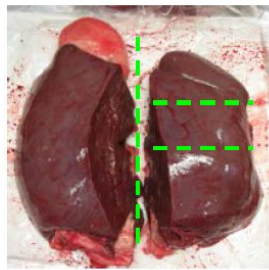


左葉中央の切り出し

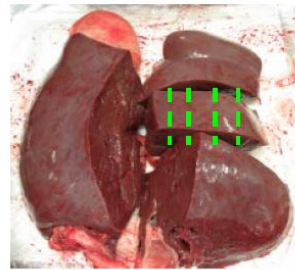


検体番号 3、4 の切り分け

図 3. 左葉の処理



右葉の切り離し

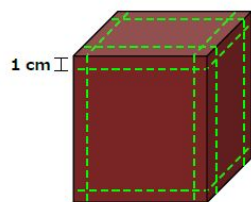


右葉中央の切り出し



検体番号 5、6 の切り分け

図 4. 右葉の処理



トリミング模式図

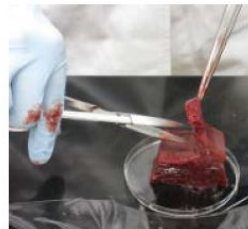
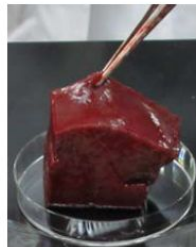


図 5. 検体表面のトリミング

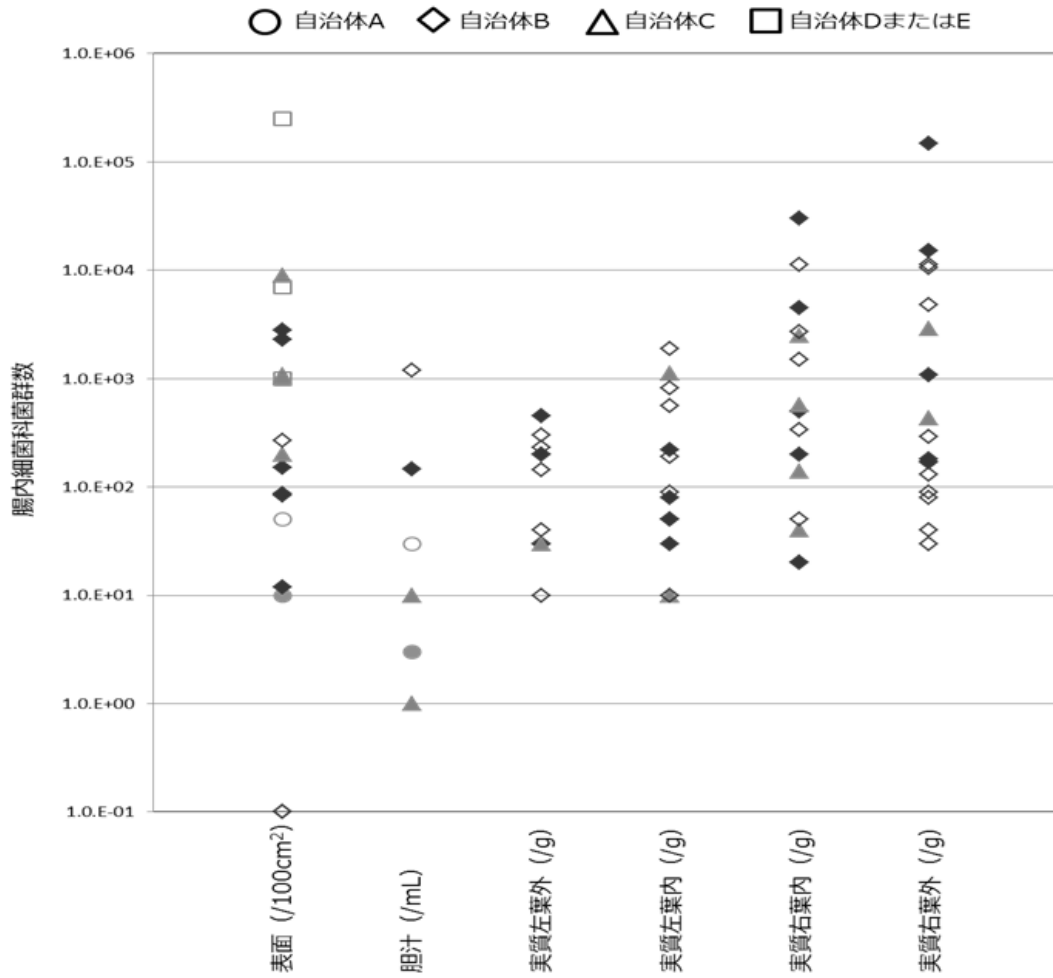


図 6. 腸内細菌科菌群の部位別検出状況

塗りつぶしのあるシンボルは夏季検体、塗りつぶしのないシンボルは冬季検体を指す。

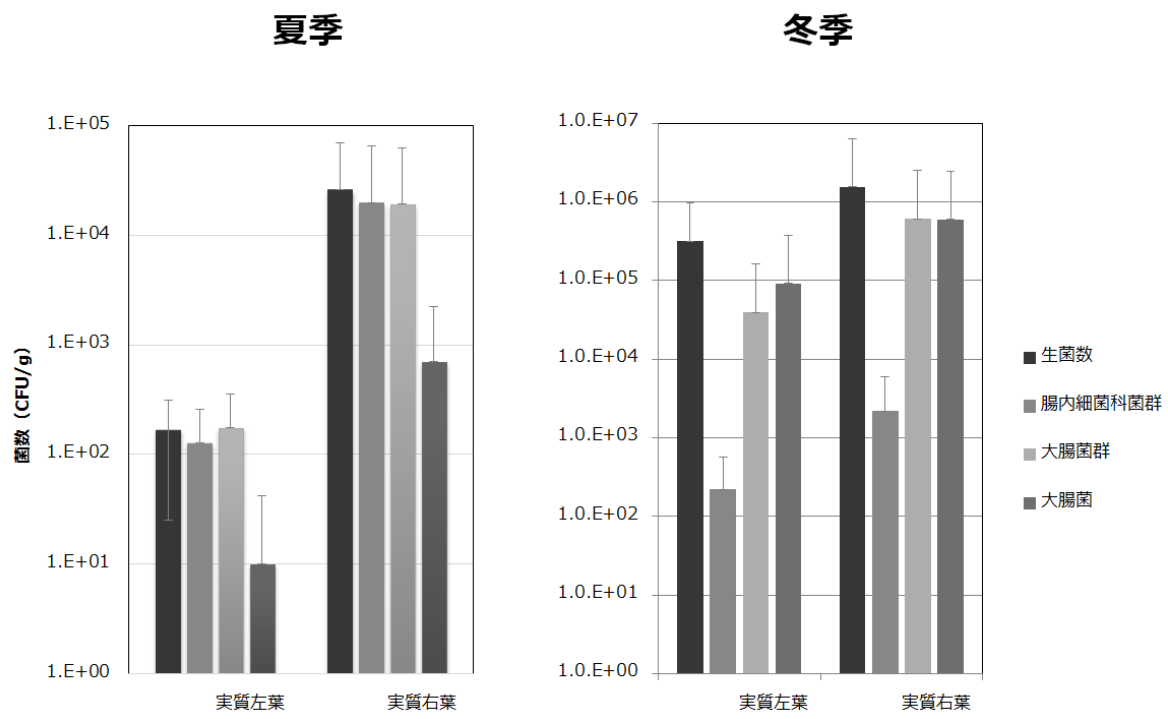


図 7. 自治体 B 由来検体における季節別指標菌検出状況 .

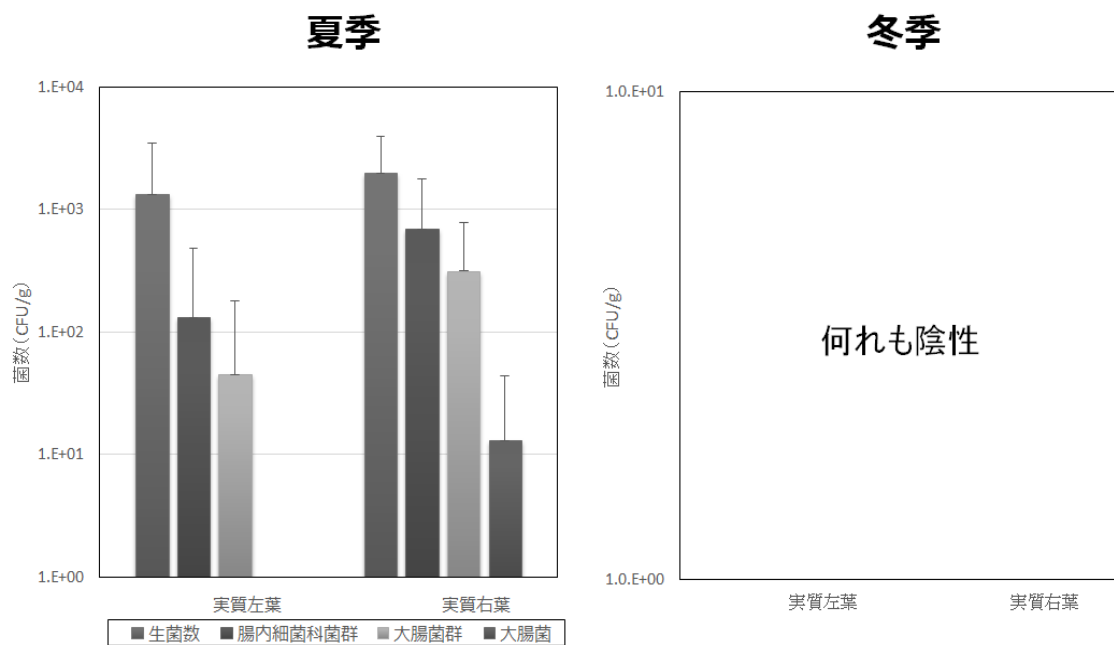


図 8. 自治体 C 由来検体における季節別指標菌検出状況 .

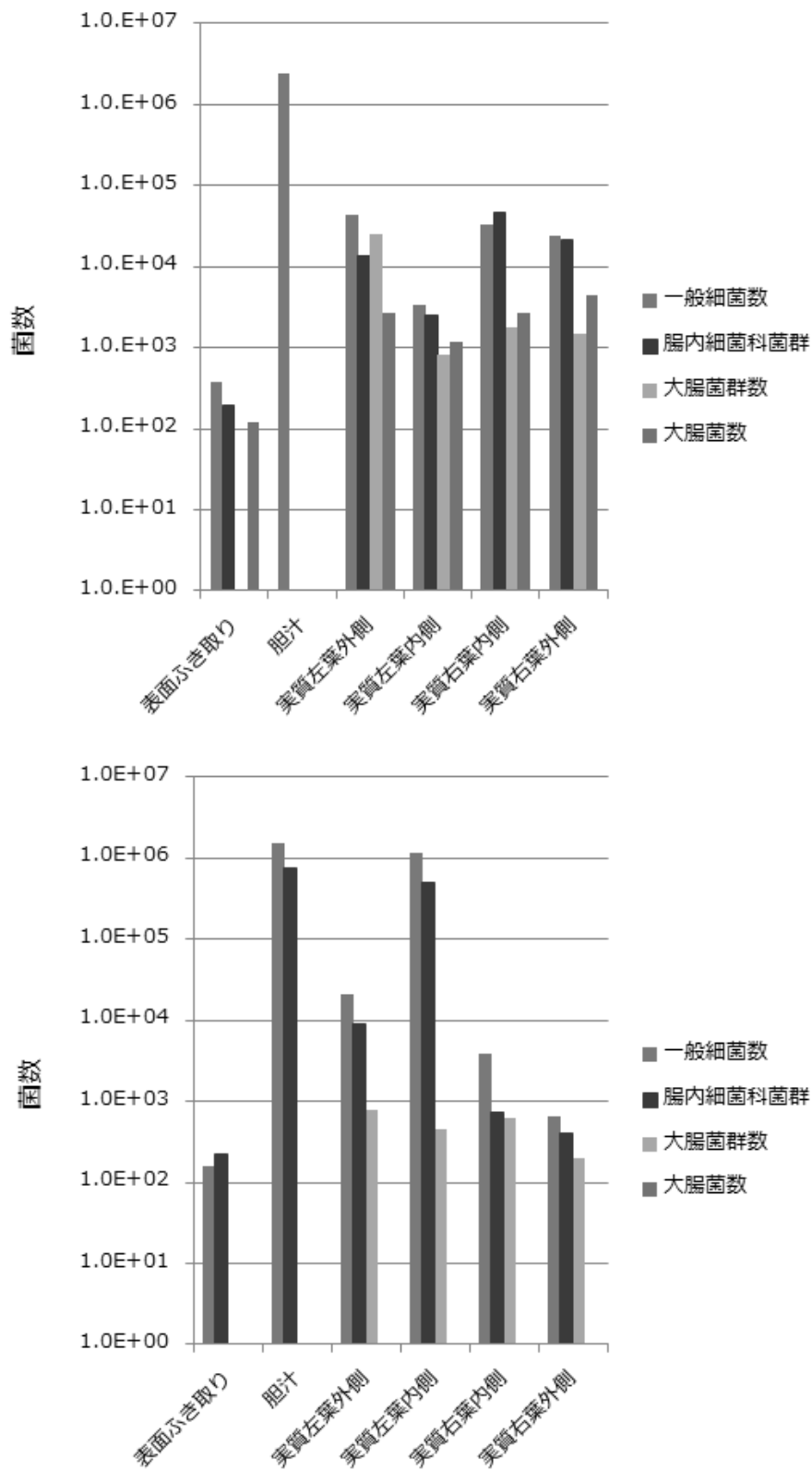


図 9 . 胆管炎を呈した 2 検体からの衛生指標菌検出状況 .

上パネルは自治体 C 由来、下パネルは自治体 D 由来の胆管炎検体を指す。

大腸菌% 2.27% 0% 0% 0.0011% 0.17% 0%*

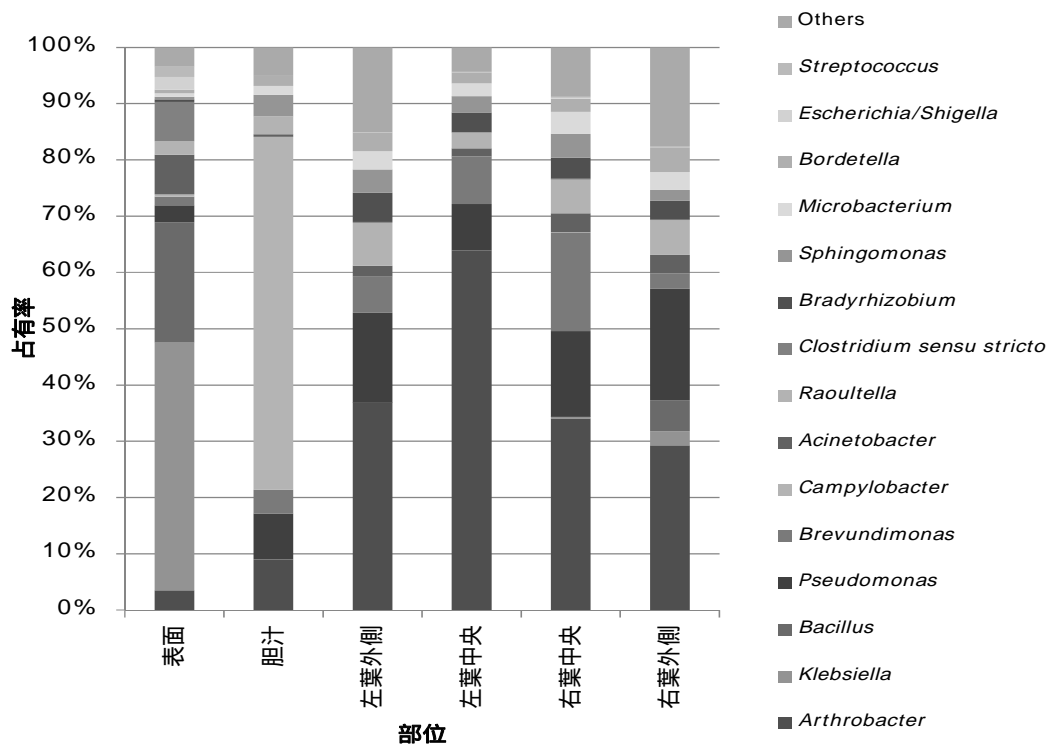


図 10 . 自治体 B 由来検体の部位別構成菌叢比較 .

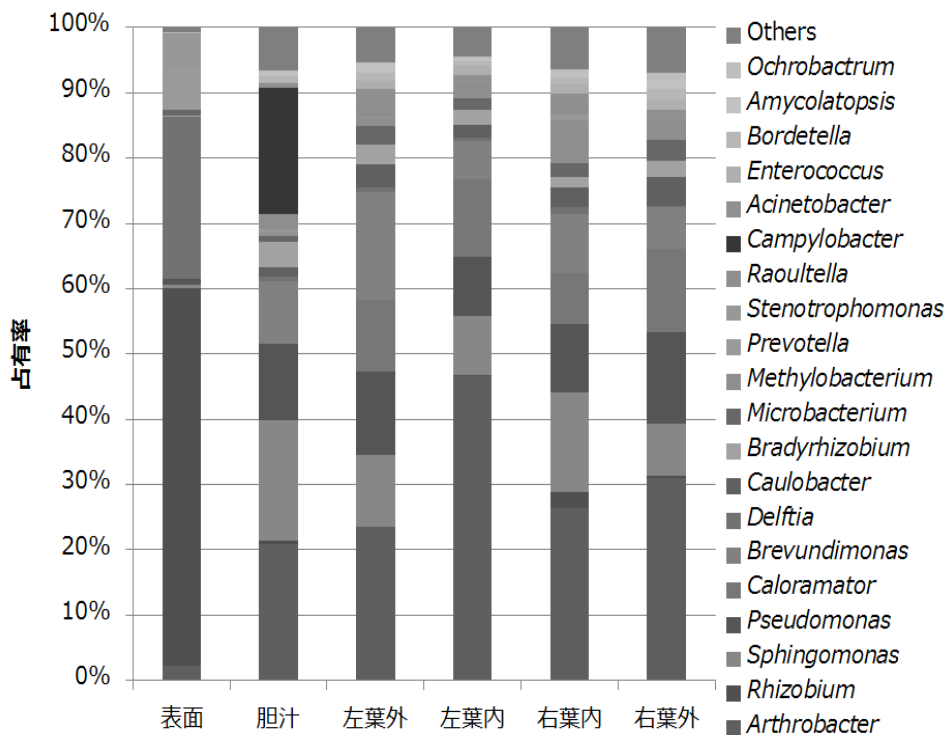


図 11 . 自治体 A 由来検体の部位別構成菌叢比較 .

* グラフ上の数値 : *Escherichia Shigella* 占有率 (夏季検体の平均値) を示す。

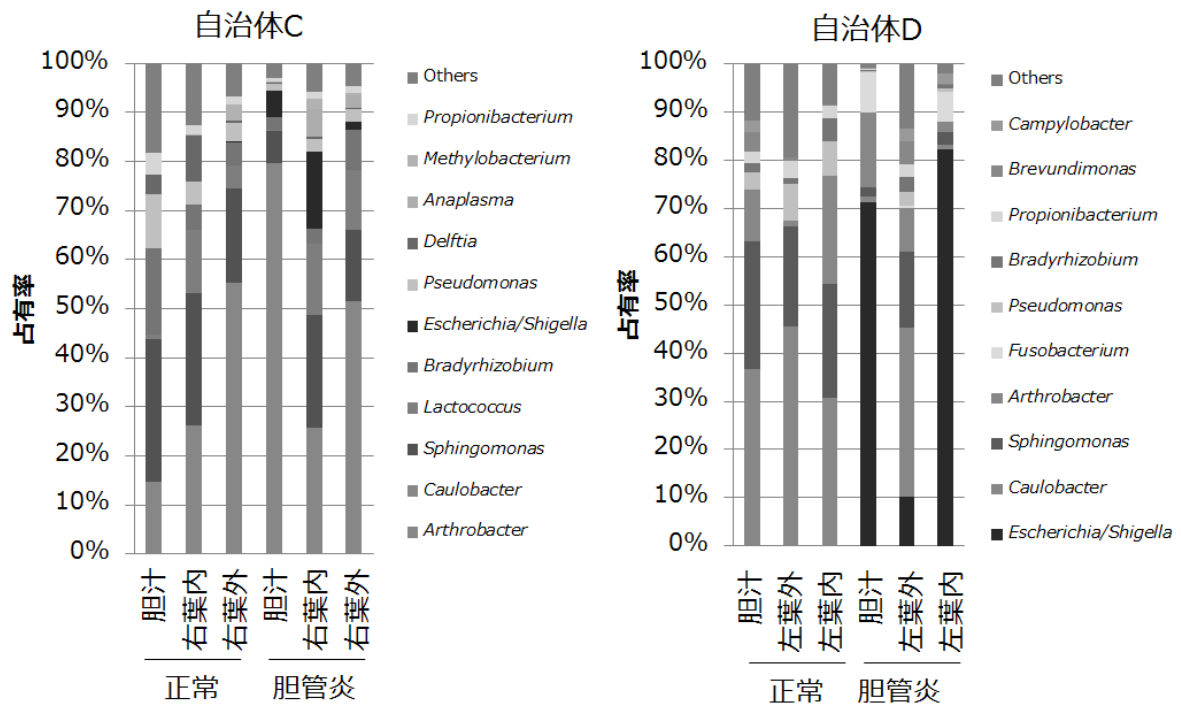


図 12 . 胆管炎を呈した検体の部位別菌叢比較 .

表1. 牛肝臓検体における指標菌数の部位別検出状況

| 部位 | 指標菌数(平均値) | | | |
|----------------------------------|-----------|---------|---------|---------|
| | 一般細菌 | 腸内細菌科菌群 | 大腸菌群 | 大腸菌 |
| 表面ふき取り (CFU/100cm ²) | 1.8E+04 | 5.6E+03 | 2.5E+02 | 5.6E+00 |
| 胆汁 (CFU/mL) | 2.3E+04 | 2.8E+01 | 5.6E+03 | 6.7E+02 |
| 実質左葉 外側(CFU/g) | 9.7E+04 | 3.7E+01 | 1.5E+04 | 3.3E+04 |
| 実質左葉 内側(CFU/g) | 3.3E+04 | 1.0E+02 | 1.5E+03 | 4.2E+03 |
| 実質右葉 内側(CFU/g) | 3.4E+05 | 1.1E+03 | 1.1E+05 | 1.2E+05 |
| 実質右葉 外側(CFU/g) | 3.0E+05 | 4.0E+03 | 1.4E+05 | 1.2E+05 |
| 実質全体(CFU/g) | 2.0E+05 | 1.3E+03 | 6.9E+04 | 8.1E+04 |
| 実質左葉(CFU/g) | 6.6E+04 | 7.2E+01 | 8.2E+03 | 2.6E+04 |
| 実質右葉(CFU/g) | 3.3E+05 | 2.6E+03 | 1.3E+05 | 1.4E+05 |

表2. 牛肝臓検体における指標菌数の施設別検出状況

| 生菌数 | 自治体A (N=10) | | 自治体B (N=15) | | 自治体C (N=9) | | 自治体D (N=9) | | 自治体E (N=6) | |
|--------|-------------|----------|-------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 |
| 表面ふき取り | 7 | 6.51E+02 | 13 | 7.37E+02 | 10 | 1.42E+04 | 7 | 2.08E+02 | 6 | 1.25E+05 |
| 胆汁 | 1 | 2.00E+00 | 5 | 7.54E+04 | 4 | 1.31E+02 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質左葉外側 | 0 | ND | 12 | 3.15E+05 | 2 | 6.22E+02 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質左葉内側 | 0 | ND | 12 | 1.04E+05 | 4 | 5.85E+03 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉内側 | 0 | ND | 15 | 1.12E+06 | 5 | 8.79E+02 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉外側 | 1 | 1.00E+00 | 15 | 9.70E+05 | 4 | 1.58E+03 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質平均 | - | 2.50E-01 | - | 6.27E+05 | - | 2.23E+03 | - | ND | - | ND |
| 実質左葉 | 0 | ND | 24 | 2.10E+05 | 6 | 3.23E+03 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉 | 1 | 5.00E-01 | 30 | 1.04E+06 | 9 | 1.23E+03 | 0 | ND | 0 | ND |

| 腸内細菌科菌群 | 自治体A (N=10) | | 自治体B (N=15) | | 自治体C (N=10) | | 自治体D (N=9) | | 自治体E (N=6) | |
|---------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|------------|-----|------------|----------|
| | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 |
| 表面ふき取り | 2 | 6.00E+00 | 9 | 3.80E+02 | 5 | 1.26E+03 | 0 | ND | 3 | 4.30E+04 |
| 胆汁 | 1 | 3.00E+00 | 2 | 8.91E+01 | 2 | 1.22E+00 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質左葉外側 | 0 | ND | 10 | 1.09E+02 | 2 | 2.00E+01 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質左葉内側 | 0 | ND | 11 | 2.67E+02 | 3 | 1.26E+02 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉内側 | 0 | ND | 11 | 3.40E+03 | 4 | 3.61E+02 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉外側 | 0 | ND | 15 | 1.27E+04 | 3 | 4.04E+02 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質平均 | - | ND | - | 4.13E+03 | - | 2.28E+02 | - | ND | - | ND |
| 実質左葉 | 0 | ND | 21 | 1.88E+02 | 5 | 7.28E+01 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉 | 0 | ND | 26 | 8.07E+03 | 7 | 3.83E+02 | 0 | ND | 0 | ND |

| 大腸菌群 | 自治体A (N=10) | | 自治体B (N=15) | | 自治体C (N=10) | | 自治体D (N=9) | | 自治体E (N=6) | |
|--------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|------------|-----|------------|-----|
| | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 |
| 表面ふき取り | 0 | ND | 7 | 1.61E+02 | 5 | 1.07E+03 | 0 | ND | 0 | ND |
| 胆汁 | 1 | 1.00E-01 | 2 | 1.84E+04 | 1 | 5.56E-01 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質左葉外側 | 0 | ND | 9 | 4.74E+04 | 2 | 2.22E+00 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質左葉内側 | 0 | ND | 11 | 4.96E+03 | 1 | 4.78E+01 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉内側 | 0 | ND | 12 | 3.56E+05 | 3 | 2.01E+02 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉外側 | 0 | ND | 14 | 4.71E+05 | 2 | 1.47E+02 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質平均 | - | ND | - | 2.20E+05 | - | 9.94E+01 | - | ND | - | ND |
| 実質左葉 | 0 | ND | 20 | 2.62E+04 | 3 | 2.50E+01 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉 | 0 | ND | 26 | 4.13E+05 | 5 | 1.74E+02 | 0 | ND | 0 | ND |

| 大腸菌 | 自治体A (N=10) | | 自治体B (N=15) | | 自治体C (N=10) | | 自治体D (N=9) | | 自治体E (N=6) | |
|--------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|------------|-----|------------|-----|
| | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 | 陽性数 | 平均値 |
| 表面ふき取り | 1 | 5.00E-02 | 5 | 5.50E+00 | 3 | 2.11E+01 | 0 | ND | 0 | ND |
| 胆汁 | 0 | ND | 0 | 2.20E+03 | 0 | ND | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質左葉外側 | 0 | ND | 5 | 1.09E+05 | 0 | ND | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質左葉内側 | 0 | ND | 4 | 1.37E+04 | 0 | ND | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉内側 | 0 | ND | 5 | 3.98E+05 | 1 | 1.11E+00 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉外側 | 0 | ND | 4 | 4.06E+05 | 2 | 1.33E+01 | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質平均 | - | ND | - | 2.32E+05 | - | 9.38E-01 | - | ND | - | ND |
| 実質左葉 | 0 | ND | 9 | 6.56E+04 | 0 | ND | 0 | ND | 0 | ND |
| 実質右葉 | 0 | ND | 9 | 4.02E+05 | 3 | 1.88E+00 | 0 | ND | 0 | ND |