

分担研究者	岡田 由美子	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	鈴木 穂高	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	吉田 麻利江	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	渡邊 真弘	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：牛肉及び牛肝臓の生食については、致命率の高い食中毒を引き起こす腸管出血性大腸菌等の感染リスクが高いことから、それぞれ平成 23 年 10 月、平成 24 年 7 月に食品衛生法に基づく規格基準が策定され、牛肝臓については安全に提供できる知見が得られるまでの間、生食用の提供が禁止された。本研究では、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、300MPa 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 2.15log 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。

#### A. 研究目的

過去の研究により、牛の肝臓からは腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラ、リステリア等の病原微生物が検出されている。日本国内では食肉に関連した食中毒事例がしばしば報告されており、特に微量の摂取でも感染が成立しうる腸管出血性大腸菌やサルモネラ属菌などによるものが知られている。食

肉中の病原微生物の除去には、十分な加熱による調理が有効であるが、生食用には適さない。また、食肉と異なり、肝臓においては病原微生物は表面のみならず内部にも存在していることが知られており、生食用食肉の加工と同様の表面除去では喫食部分から微生物を取り除くことはできない。肝臓を生食するためには、内部汚染菌に有効な非加熱殺菌によ

る処理技術を確立し、感染リスクの低減を図る必要がある。

非加熱殺菌法には、放射線、高電圧パルス、パルス光等があり、その中でも静水圧を利用した高圧処理は、食品本来の香り、色、風味が保持されるとして、近年注目を集めている。先行研究においては、400MPa及び500MPaの処理により非病原性大腸菌を5logの低減が可能であった一方で、肝臓の肉色及び肉質変化が著しいことが明らかとなった。また、250MPa180分の処理では、肝臓の肉色及び肉質に及ぼす影響について検討を行ったところ、肝臓の肉質変化は抑えられたものの、菌数の低減は2logにとどまることが示された。本研究においては、今年度はより高い菌数低減効果を得られる条件を見出すことを目的とし、高圧処理と、処理前後の検体保管温度の組み合わせについて検討を行った。

## B. 研究方法

### (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 °C 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 °C 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内で更に

シールして密封した。

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 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 (図 1: 神戸製鋼株式会社) を用いて 250 MPa 及び 500 MPa で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 °C、4°C又は室温に設定した。高圧処理前の保管温度は、- 20 °C又は室温に、高圧処理後の保管を行う場合の温度は - 20 °C又は - 80 °C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 °C又は 4 °Cに設定した。高圧処理前の保管温度は、- 80 °Cから 4 °C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 µ l 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°C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 $\mu$ lをBHI寒天平板及びCHROMagarサルモネラ平板に塗布後、37°C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°C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. 結果

#### 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。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1.26~2.15 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°C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、写真を図3に示した。処理前に4°Cで保管し、高圧処理を4°C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°Cで保管し、4°C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°Cで保管し、-20°C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°Cで保管し、高圧処理を4°C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°Cで保管し、4°C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°C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°Cで保管し、-20°C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(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(図3-5~7)。

#### D. 考察

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、0.288logの低減のみを示し、JCM1651株の1.78log、LT2株の2.59log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で検討

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°C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2.15log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

なし

#### G. 研究発表

なし

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

図1. 高压容器



図 2-1. サルモネラ属菌 3 菌株における高压耐性

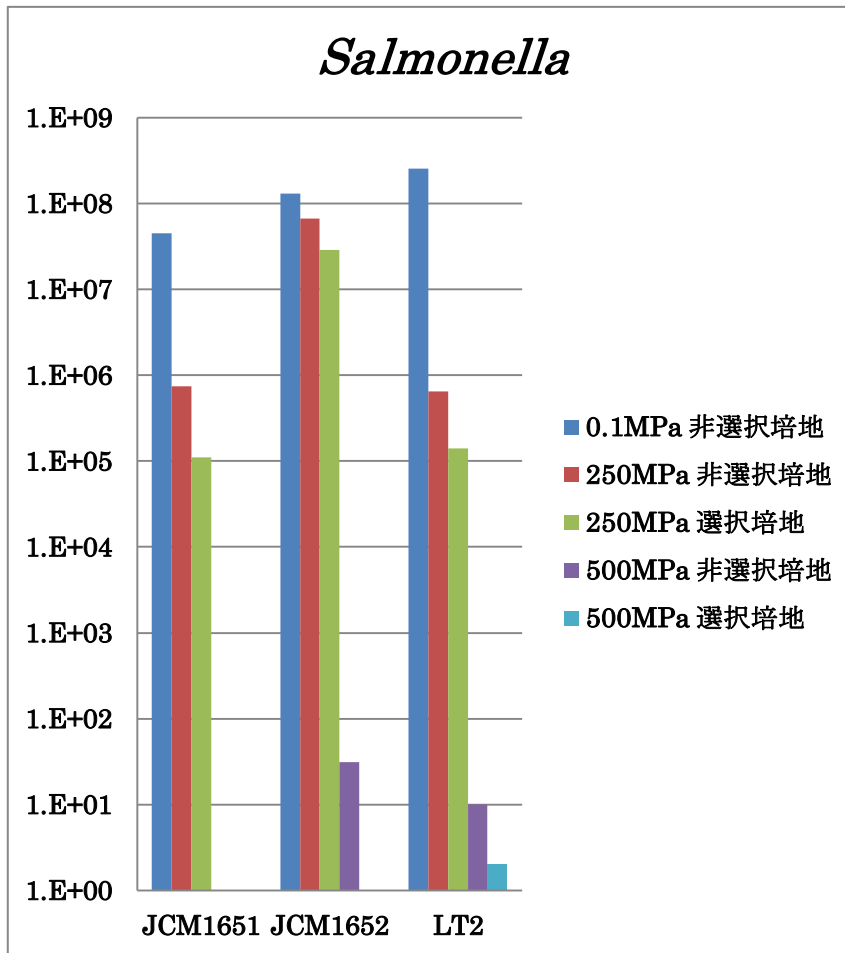


図 2-2. 病原大腸菌 4 菌株における高圧耐性

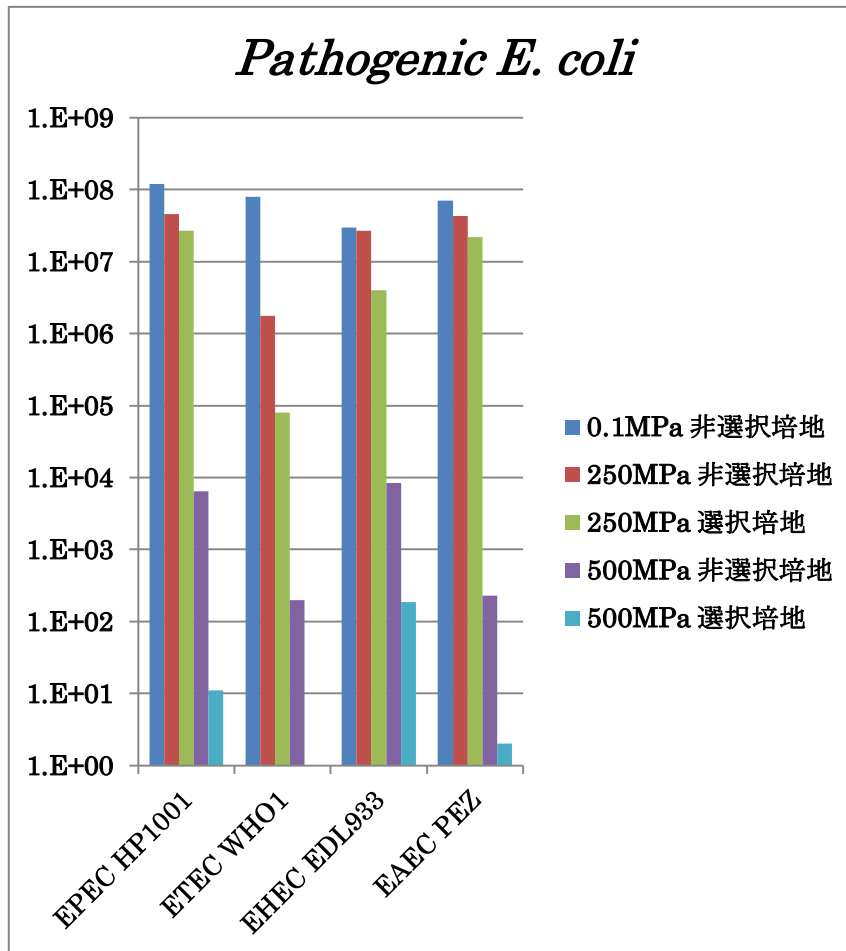




表 1-1. 高圧処理前後の保管温度が *Salmonella enterica* JCM1652 の菌数低減に及ぼす影響

処理前保管	高圧処理温度	処理後保管	低減菌数(log)	
			非選択培地	選択培地
室温	室温	なし	-1.744727495	-3.318758763
- 20°C	室温	なし	-2.15490196	-3.795880017
室温	室温	- 80°C	-1.795880017	-3.187086643
- 20°C	室温	- 80°C	-2.050609993	-2.958607315
室温	4°C	なし	-1.259637311	-2.065501549
- 20°C	4°C	なし	-1.677780705	-2.397940009
室温	4°C	- 20°C	-1.443697499	-2.431798276
- 20°C	4°C	- 20°C	-1.958607315	-2.853871964

表 1-2. 高圧処理前後の保管温度が EHEC EDL933 の菌数低減に及ぼす影響

処理前保管	高圧処理温度	処理後保管	低減菌数(log)	
			非選択培地	選択培地
室温	室温	なし	-2.113509275	ND
- 20°C	室温	なし	-2.022276395	-3.823908741
室温	室温	- 80°C	-1.408935393	-3.602059991
- 20°C	室温	- 80°C	-1.88941029	-4

表 2. 高圧処理による牛肝臓の肉質変化

条件	検体	保管温度	処理温度	圧力		硬さ (最大破断点)	色調		
							L	a	b
1	1	4°C	4°C	250	処理前	2.54211	24	10.2	6.8
					処理後	1.66618	24.3	11.1	6.2
	2				処理前	3.19906	26.4	10.4	5.4
					処理後	2.90391	27.3	9.8	5.4
2	1	4°C	4°C	300	処理前	1.55193	25.1	10.1	5.4
					処理後	1.93277	28.6	11.4	8
	2				処理前	2.71349	24.7	10.1	6.2
					処理後	2.31361	27.7	10.4	6.6
3	1	4°C	4°C	400	処理前	1.88516	24.3	9.3	5
					処理後	3.56086	33.5	13.4	12.3
	2				処理前	1.47576	24.6	11.6	6.5
					処理後	3.07529	36	13.3	11.5
4	1	- 20°C	4°C	250	処理前	2.36121	24.5	11.2	6.5
					処理後	3.77985	31	13.7	9.1
	2				処理前	3.95122	24.8	13.2	8.9
					処理後	4.32254	29.6	14.8	9.7
5	1	- 20°C	4°C	300	処理前	2.10415	23.1	8.4	3.9
					処理後	3.01816	30.1	12.7	9.9
	2				処理前	1.89468	23.1	10.9	6.4
					処理後	2.50403	31.3	14.8	10.7
6	1	- 20°C	4°C	400	処理前	2.0851	24.5	9.5	5.6
					処理後	3.20858	29.5	10.9	8.9
	2				処理前	2.15175	22	10.3	6.7
					処理後	2.81822	31.6	12.6	12.1
7	1	- 80°C	- 20°C	250	処理前	2.42786	25.1	8.2	3.8
					処理後	2.53259	23.4	9.9	6.1
	2				処理前	2.2184	24.6	9.7	5.4
					処理後	2.70397	22.1	10.5	6.8
8	1	- 80°C	- 20°C	300	処理前	2.65636	23.6	8.9	4.7
					処理後	4.54153	31.6	14.6	12.5
	2				処理前	4.59865	25.5	10	4.7

					処理後	3.7132	30.7	14.6	12.5
9	1	- 80°C	- 20°C	400	処理前	1.64714	21.8	10.7	5.8
					処理後	1.45672	22.6	11.6	8.7
	2				処理前	3.03721	21.1	10.7	5.9
					処理後	1.37103	23.9	10.6	8

図 3-1. 未処理の牛肝臓



図 3-2. 250 MPa 5 分の高圧処理後の肝臓

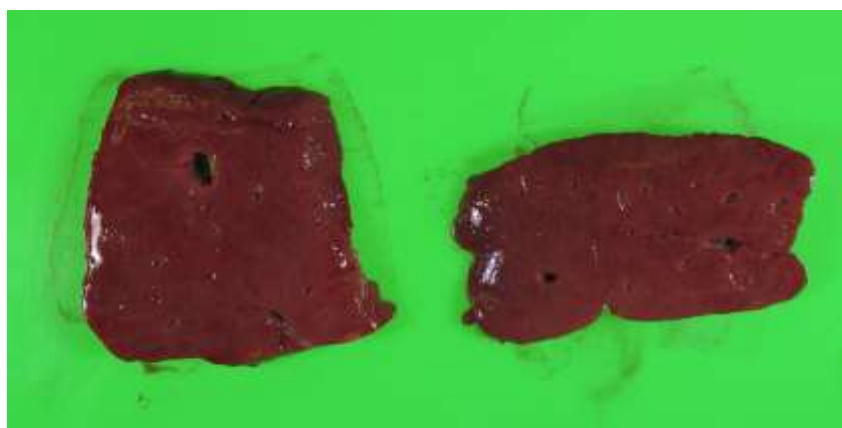


図 3-3. 300 MPa 5 分の高圧処理後の肝臓

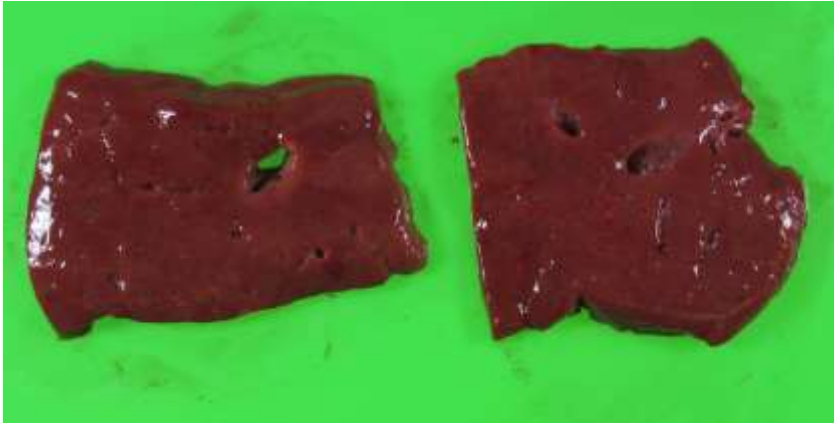


図 3-4. 400 MPa 5 分の高圧処理後の肝臓

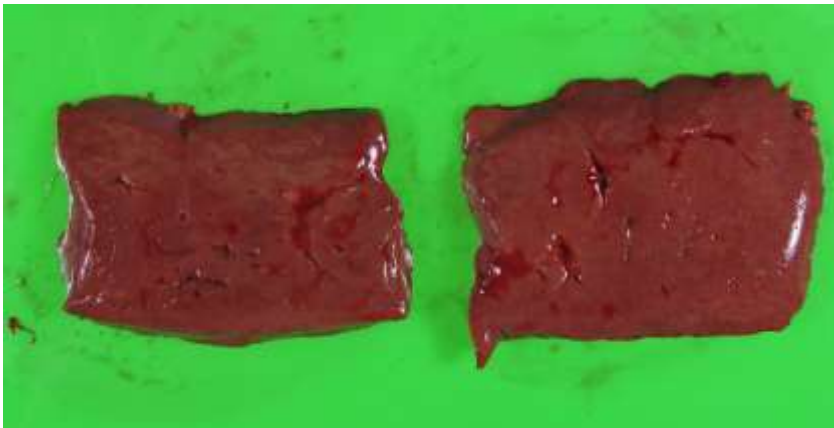


図 3-5. 18 時間 4°C で保存した牛肝臓



図 3-6. 18 時間 -20°C で保存した牛肝臓



図 3-7. 18 時間 -80°C で保存した牛肝臓

