

平成29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
研究分担者	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
	方波見佐知子	青森県十和田食肉衛生検査所
	藤森亜紀子	岩手県食肉衛生検査所
	相馬 要	千葉県東総食肉衛生検査所
	白木 豊	岐阜県食肉衛生検査所
	西部 尚史	岐阜市食肉衛生検査所
	久本千絵	兵庫県食肉衛生検査センター
	尾島康世	高知市食肉衛生検査所
	清島綾子	福岡県食肉衛生検査所
	川瀬 遵	島根県食肉衛生検査所
	城間 健	鹿児島県阿久根食肉衛生検査所

研究要旨：昨年度行った牛肝臓における細菌汚染部位及びその局材性等に関する知見の収集をより発展させるため、平成29年6月～9月（夏季）及び同年12月～30年2月（冬季）に、計10自治体が管轄する食肉センター（自治体A～J）でとさつ・解体された計98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、細菌試験に供した。このうち、自治体C・F・H管轄下の施設で採材された計5検体は胆管炎等を呈していたため、健常検体とは識別した。計93頭分の検体について、牛肝臓表面、胆嚢内胆汁、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行ったところ、計76頭分（81.7%）の肝実質検体は腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の全てに陰性を示し、腸内細菌科菌群が検出されたものは計14頭分（15.1%）であった。昨年度、試験開始迄に約3時間の輸送時間を要した自治体Cでは本年度は採材直後に試験を行い、8頭分のうち、7頭分の肝実質で上述の糞便汚染指標菌が陰性となったこと、胆嚢を結紮・除去せずに一夜かけて冷蔵輸送を行った後の肝実質中の腸内細菌科菌群数は概ね 10^4 オーダーとなった状況等から、採材後速やかな牛肝実質を加工に供することが細菌汚染低減に資する対策の一つと目された。肝実質より腸内細菌科菌群が検出された計14頭（最大菌数 4.3×10^4 CFU/g）の肝臓等検体のうち、胆汁で同菌陽性を示した個体の肝実質では同菌の広範囲に亘る汚染が認められたことから、胆汁検査により、高い糞便汚染指標菌汚染分布を示す牛肝臓を排除できる可能性が示唆された。来年度は、上記の知見を踏まえ、胆汁検査の有用性ならびに製造（加工）基準として採材工程を含める意義を検証するため、代表的なとちく場で通常検査ならびに処理工程を経て出荷直前にある牛肝臓を対象に実質等での細菌汚染実態を調査し、同施設環境及び工程を通じた衛生管理対策の確保に資する知見の創出にあたりたい。

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、その成績の創出が期待されている。

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)の協力をより発展的に求めつつ、とさつ・解体直後に通常の処理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として、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したので、報告する。

B. 研究方法

本研究では、計10自治体(A~J)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

検体は、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黒毛・褐毛和種であること。
- (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。
- (ii) 生体検査において異常を認めない個体であること。
- (iii) 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。
- (iv) 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 度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℃以下で冷蔵保存を行い、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)

19.5 G の滅菌済注射針を 10 mL 容の滅菌

済ディ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、10 mL 以上の胆汁を回収した(図2)。回収した胆汁は 15 mL の滅菌遠心管(A-2等のラベルを行う)へ移し変え、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。

滅菌済ディスポーザブルタイプのメス及び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、滅菌済メス及びピンセットは1面切ると共に、70%エタノール及び滅菌水による消毒洗浄を行った。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

積列を作成した。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 Genious 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 100 μ l 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 *stn* 遺伝子及び *stx* 遺伝子を PCR 法により検出した。

6. 胆嚢を結紮・除去せずに、チルド輸送した牛肝臓の細菌汚染実態調査

自治体 C で衛生的に採材した牛肝臓検体を、胆嚢を結紮・除去せずに、当所まで一夜かけてチルド輸送し、肝臓実質及び胆汁の細菌汚染実態について、上項 2.5 に準じて評価した。

C. 結果

10 自治体 (A~J) の協力を得て、各食肉センターでとちく解体された計 98 頭の牛肝臓検体を採取した。これらのうち、5 頭分の肝臓については、採材後に行われた

と畜検査により、胆管炎や膿瘍が認められたことから、異常検体として整理を行い、健全検体対象からは除外した。

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 (98 頭 x 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 及び 2)

(i) 一般細菌

表面拭き取り検体では、計 93 頭分の牛肝臓表面における拭取り成績として、82 検体で陽性を示し (陽性率 88.2%)、陰性検体も含めた全体の平均値は 2.9×10^3 CFU/100cm² (最小値: 検出限界以下、最大値: 1.2×10^5 CFU/100 cm²) であった。

胆汁検体については、計 13 検体が陽性を示し、最大値は 4.1×10^6 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、それぞれ 29 検体 (陽性率 31.2%) および 31 検体 (同 33.3%) 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 3.6×10^2 CFU/g であった。

(ii) 腸内細菌科菌群

表面拭き取り検体のうち、38 検体では腸内細菌科菌群が検出され (40.9%)、最大値は 2.5×10^5 CFU/100cm² であった。

胆汁検体については、6 検体が陽性となった (陽性率 6.5%) 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、9 検体および

11 検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 4.3×10^4 CFU/g であった。

(iii) 大腸菌群

表面拭き取り検体では、31 検体から大腸菌群が検出され（33.3%）、最大値は 1.2×10^4 CFU/100cm² であった。

胆汁検体では、4 検体が陽性となり（陽性率 4.3%）、最大値は 3.2×10^5 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、6 検体および 10 検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 3.0×10^2 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 21 検体あり、最大値は 1.8×10^2 CFU/100cm² であった。胆汁検体は 3 検体が陽性となった。

実質左葉・右葉検体では、4 検体および 2 検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 3.6×10^3 CFU/g であった。

2) 施設別の成績比較（表 2 及び図 6-15）

(i) 自治体 A

自治体 A では夏季 5 検体、冬季 5 検体の検討を行った。同施設での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 69%、所属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。

計 10 検体は表面を除く、胆汁・実質部位において、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が陰性を示した。肝臓表面の一般細菌数は夏季の平均値が 2.4×10^3 CFU/100 cm²、冬季が 2.1×10^2 CFU/100 cm² であった。腸内細菌科菌群陽性数も夏季が 3 検体であったのに対し、冬季は 1 検体のみにとどまっていた。

(ii) 自治体 B

自治体 B では夏季及び冬季でそれぞれ 5 検体の協力調査を行った。対象施設での牛肝臓検査合格率は約 66%、自治体管内あるいは近隣自治体管内からの搬入割合は約 87%であった。牛肝臓は解体後、速やかに専用の吊下げレーンで運搬・検査を受けていた。

表面からの検出状況として、夏季には、一般細菌数平均値が 1.4×10^3 CFU/100 cm² となり、冬季の同数値 1.9×10^2 よりも高い傾向にあったほか、実質 1 箇所より腸内細菌科菌群が検出された（冬季には検出されず）。なお、胆汁からはすべての指標菌は不検出であった。

(iii) 自治体 C

昨年度は牛肝臓等の検体をとちく施設で採材後、冷媒を入れた発砲スチロール箱を用いて 3 時間程度冷蔵輸送した後、試験に供しており、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。これと呼応するように、細菌試験成績は他施設に比べて相対的に高い指標菌数値であったことから、保管・輸送状況による細菌汚染状況への影響を評価するため、本年度は当該自治体の協力を得て、採材後の速やかな試

験を実施した。

対象施設の牛肝臓検査合格率は約 80%、当該自治体あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 85%であった。

同自治体では夏季・冬季でそれぞれ 5 検体を採材対象としたが、実質切出しの際に、夏季 1 検体、冬季 1 検体ではそれぞれ内部に膿瘍を認めたため(左葉限局性) 健常検体対象から削除した。

肝臓表面の一般細菌数平均値は夏季では 3.6×10^2 CFU/100 cm²、冬季で 3.2×10^4 CFU/100cm²であった。胆汁は 1 頭の検体で陽性となった。また、肝実質からは、夏季検体の実質右葉 1 箇所より、 6.3×10^0 CFU/g と少数の一般細菌の検出を見たものの、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌はいずれも検出されなかった。冬季の肝実質からは一般細菌を含めたすべての指標菌が不検出であった。

一方、異常を認めた 2 検体については、いずれも高い実質内からの腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の汚染を認めた。

(iv) 自治体 D

自治体 D では、今年度からの協力を得て、夏季 5 検体、冬季 5 検体を対象とした検討にあたった。対象施設での採材から試験開始までの所要時間は約 45 分から 1 時間 50 分で、清浄な金属バットに受け取った後、ビニール袋に入れ、冷媒を入れたクーラーボックスで 10 以下を確保しつつ、検査室へ搬送された。なお、同施設での牛肝臓検査合格率は約 98%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 98%であった。

対象施設での検討成績としては、夏季・

冬季間で大きな差異を認めず、夏季の実質 1 検体及び冬季の胆汁 1 検体を除き、実質及び胆汁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。一般細菌については、10 頭中 8 頭の実質及び 1 頭の胆汁より検出されたものの、同菌数の最大値は 2.3×10^3 CFU/100 cm²と大きな数値ではなかった。

(v) 自治体 E

自治体 E からは、自治体 D と同じく本年度からの協力を得て、夏季 5 頭、冬季 5 頭の検討を行った。対象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～1 時間 50 分であり、とたいより摘出された肝臓は、肝臓運搬用フックに掛け、検査台へ運搬し、検査合格後にフックから外して水洗したものを清浄なビニール袋に入れ、氷を入れたクーラーボックスで冷却輸送された。同施設での牛肝臓検査合格率は約 45%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 99%であった。

対象施設での成績として、肝実質及び胆汁については腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌のすべてが不検出であった。一般細菌数については、夏季 1 頭分の胆汁、ならびに冬季 3 頭分の実質と 2 頭分の胆汁より検出され、両部位の最大値はそれぞれ 7.5×10^3 CFU/g、 2.7×10^4 CFU/ml であった。また、表面における一般細菌数は夏季平均が 5.0×10^2 CFU/100cm²、冬季平均が 1.5×10^2 CFU/100cm²と前者がやや高い数値ではあったものの、統計学的有意差は認められなかった。

(vi) 自治体 F

自治体 F では昨年度と同様の採材及び試験までの保管輸送にあたった（昨年度は自治体 C とした）。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が 30 分～1 時間 30 分、冬季が 2 時間～3 時間であった。採材を行った夏季 5 頭、冬季 5 頭分の肝臓のうち、それぞれ 2 頭分については、鋸屑肝、一部被膜破損、膿瘍等の異常が認められたため、細菌試験の対象からは除外した。

実質における指標菌分布については昨年度と同様、右葉からの検出数は左葉に比べて高い傾向にあり、腸内細菌科菌群数及び大腸菌群数の最大値は 2.6×10^3 CFU/g、 1.5×10^3 CFU/g であった。大腸菌はすべての肝臓実質検体で不検出であった。一般細菌数は、実質において腸内細菌科菌群や大腸菌群と同様に右葉で左葉よりも高い傾向を示した。また、季節別では夏季により高い菌数を認めた。表面においても、同様に夏季で高い菌数を示し、最大値は 1.3×10^3 CFU/100cm² であった。なお、胆汁からはすべての指標菌が不検出であった。

(vi) 自治体 G

自治体 G からは、本年度からの協力を得て、夏季 6 頭、冬季 2 頭の検討を行った。このうち夏季 1 頭分については、軽度の胆管炎を認めたことから、健常牛由来検体からは排除した。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季で 5 分～40 分、冬季は 1 時間 25 分～2 時間 30 分であった。とたいより摘出された肝臓は、肝臓用のトレイに入れて検査台へ運搬し、検査合格後、清潔なビニール袋に入れて、

氷を入れたプラスチックコンテナに移し、採材から 10 分以内に試験室へ搬送していた。同施設での牛肝臓検査合格率は約 54%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 92% であった。

実質から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検出された個体はそれぞれ夏季が 2 頭分、2 頭分、1 頭分、冬季が共に 1 頭分であった。これらの最大値は腸内細菌科菌群が 3.9×10^2 CFU/g、大腸菌群及び大腸菌が共に 3.0×10^2 CFU/g であった。右葉・左葉間でこれら糞便汚染指標菌の分布に有意差は認められなかった。実質からこれらが検出された夏季の 1 個体では、胆汁からも検出され、その最大値は腸内細菌科菌群及び大腸菌群が共に 1.5×10^5 CFU/ml、大腸菌は不検出であった。同個体由来肝臓実質における各糞便汚染指標菌の分布は総胆管遠位部に比べ、同近位部でより高い数値を取る傾向にあった。

(vii) 自治体 H

自治体 H では昨年度に引き続き、同様の採材及び試験までの保存輸送方法により対応した（昨年度は自治体 D とした）。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が 5 分～15 分、冬季が 10 分～1 時間 45 分であった。なお、対象施設の牛肝臓検査合格率は約 80%、当該自治体あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 80% であった。

採材を行った夏季 5 頭、冬季 5 頭分の牛肝臓等について細菌試験を行ったところ、夏季の 1 頭分の牛肝臓実質より、35CFU/g の腸内細菌科菌群が検出された。当該検

体において、大腸菌群及び大腸菌は陰性であった。冬季5頭分については、全ての糞便汚染指標菌は実質で検出されなかった。腸内細菌科菌群陽性個体の胆汁からは糞便汚染指標菌はいずれも不検出であった。

(viii) 自治体 I

自治体 I では昨年度と同様の採材及び試験までの保管輸送にあたった（昨年度は自治体 E とした）。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が50分～1時間20分、冬季が55分～1時間30分であった。採材を行った夏季6頭、冬季6頭分の牛肝臓の全てが健常検体として取り扱われた。

実質における指標菌分布については夏季1頭分が右葉で腸内細菌科菌群及び大腸菌群陽性となり、同数値はそれぞれ40CFU/g及び5CFU/gであった。冬季検体でも1頭分が腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が右葉・左葉共に陽性を示し、それぞれの最大値で 4.1×10^3 CFU/g、 3.8×10^3 CFU/g、 3.6×10^3 CFU/gであった。胆汁からは夏季1頭分を除き、一般細菌数を含む全ての指標菌が不検出であった。実質より腸内細菌科菌群が検出された2頭分の牛肝臓表面からは実質で腸内細菌科菌群陰性であった牛肝臓に比べ、相対的に高い腸内細菌科菌群数を認めた（ 6.8×10^3 CFU/100cm²、 1.9×10^5 CFU/100cm²）。

(x) 自治体 J

自治体 J には本年度より研究協力者として参加いただくこととなった。対象施設では、とたいより肝臓を摘出後、赤物検査用フックにかけ、約5分後に内臓検査場所で

表面ふき取りを実施し、結束バンドで胆嚢管を結紮した。その後、ビニールを敷いたバットに肝臓を受け、保冷剤を入れたクーラーボックスまたは発砲スチロールに入れて検査室に搬入した。同施設における採材から試験開始までの時間は8分から26分であった。なお、同施設における牛肝臓の検査合格率は約70%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約90%であった。

採材対象検体数は夏季5頭、冬季5頭とした。このうち、6頭分の牛肝臓実質からは腸内細菌科菌群が検出され、最大値は夏季が65CFU/g、冬季が600CFU/gであった。また、大腸菌群は夏季1頭分、冬季2頭分より検出され、最大値は480CFU/gであった。大腸菌は冬季1頭分で検出され、その最大値は160CFU/gであった。なお、一般細菌は1頭分を除くすべての牛肝臓実質から検出された。以上の指標菌の左・右葉における菌数分布に有意差は認められなかった。

胆汁における指標菌検出成績として、実質左右葉で腸内細菌科菌群が認められた夏季2頭分の胆汁からは同様に腸内細菌科菌群が検出されたが、限局性に実質から同菌が検出された牛肝臓の胆汁は陰性を示した。

3. 腸内細菌科菌群の胆汁及び肝実質における分布の相関性

腸内細菌科菌群が肝実質より検出された個体の各部位での同菌個体別あるいは部位別汚染状況を比較検討するため、図16を作成した。同図に示したように、胆汁検体に同菌の高濃度汚染が認められる個体では、肝実質左右両葉にわたっての同菌汚染を認

めることが明らかとなった。しかしながら、肝実質における本菌の高濃度汚染は胆汁での同菌汚染を可逆性をもって指し示すものとは言い難いことも同時に示された。

4. 異常肝臓における指標菌分布

とたいからの摘出後に何らかの異常を示した計 6 頭分の牛肝臓等については、鋸屑肝、被膜の破損、膿瘍、胆管炎等の診断が下された。これらの指標菌検出成績概要には図 16 に記したとおりである。このうち、肝実質内に膿瘍を認めた 2 頭分の肝臓等については、膿瘍局在部位に腸内細菌科菌群の高い分布を認めたが、胆汁からは不検出であった。同指標菌は衛生指標としての位置づけのみならず、と畜検査における剖検診断の根拠としても有用であると考えられた。一方、鋸屑肝や被膜破損等を示した牛肝臓等については、糞便汚染指標菌の増加を認めなかった。

5. 胆嚢を結紮・除去せずに冷蔵輸送された牛肝臓内部及び胆汁の細菌検出状況

自治体 C 管内の施設で衛生的に採材後、胆嚢を結紮・除去せずに一夜かけて冷蔵輸送した牛肝臓等検体における細菌汚染状況を到着日（解体翌日）に検討した。表 3 に示した通り、計 5 か所から採材した実質右葉での腸内細菌科菌群数は平均 3.8×10^4 CFU/g と、衛生的な採材を行い、胆嚢を結紮または除去後、速やかに供試した検体に比べ、高い値を示した。また、胆汁における同菌数については更に高値を示し、平均値は 1.6×10^6 CFU/mL であった。

D. 考察

本研究では、計 10 自治体の協力を得て、食肉センターでとさつ・解体された直後にとちく検査員（獣医師）の監視指導の下、衛生的に取り出した牛肝臓等を対象として、細菌汚染実態を検討した。

施設別成績として、肝実質から腸内細菌科菌群が検出された検体は計 8 施設で認められた。残り 2 施設（自治体 A 及び C）で採材された検体は異常症例を除き、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がいずれも陰性を示し、衛生的な採材から検体確保、試験実施等が行われたことが示唆された。

このうち、自治体 C では昨年度肝実質で高い腸内細菌科菌群数を認めたが、本年度は採材から試験までを同自治体担当者の積極的な協力により実施に至った。昨年度と本年度の間で認められた成績の差異の推定要因としては、採材から試験開始までの時間短縮及び検体の安定的な温度管理等が挙げられる。すなわち、牛肝実質の衛生確保においては、採材方法を考慮しつつ、衛生的施設設備環境下で、速やかな加工処理を進めることが実効性を持つ手法として設定できる可能性を示唆するものと考えられる。

この他の昨年度との変更点としては、細切器具の違いが挙げられる。すなわち昨年度、自治体 C（本年度は自治体 F とした）では肝実質細切時に夏季・冬季で異なる細切器具を用いており、これが影響していたためか、両季節間で細菌検出成績が大きく異なっていたことが導入の背景にある。ディスプレイブルタイプのレーザーによる条件の更なる統一化を行ったが、当該自治体の夏季成績は冬季成績に比べ、前年度と同様に高い数値にあった。夏季は、輸送・搬入・繋留時に牛生体が外的ストレス等を受けや

すい状況にあり、とちく前段階における生体側の環境依存性とも思える挙動が細菌検出状況に影響を及ぼしているとも考えられる。

異常を呈する牛肝臓等の検証は各自治体のとちく検査員により実施されている、と畜検査により排除されうるものであるが、牛肝実質等の食品としての安全性確保にあたっては、同マトリックスにおける腸内細菌科菌群等の汚染が極力ないものを選定し、更に応用手法による細菌汚染低減効果を最大限に活用することが有効な手立てと考えられる。仮に生食等に供することを想定する場合には、最終製品において腸内細菌科菌群に係る検証試験を設定することは必要不可欠な事項と考えられるが、製造基準等には簡易に採材できる、胆汁等を用いた腸内細菌科菌群の試験成績を併用することで、微生物学的品質の確保につながるロジックとなりうるものと思われる。

実際に、胆嚢を結紮・除去せずに長時間低温輸送・保存した場合の腸内細菌科菌群数の分布成績は、胆汁が媒体となり腸内細菌科菌群をはじめとする糞便汚染指標菌の実質への拡散を助長することを示唆するものといえよう。肝実質における細菌の拡散・増殖を抑制するための衛生的管理の在り方として、速やかな胆嚢の除去があることはいうまでもないが、同部位のスクリーニング部位としての活用は今後の更なる検討により明らかにされうるものと考えられる。

E. 結論

計 93 頭分の健常牛肝臓等での細菌汚染実態を調査し、以下の知見を得た。

- ・ STEC 及びサルモネラ属菌は全検体で陰性となった。

- ・ 衛生的に摘出・管理した牛肝実質における腸内細菌科菌群の最大菌数は 4.3×10^4 CFU/g であった。

- ・ 採材後の速やかな胆嚢除去及び温度管理が汚染拡大防止に有効であることを示す知見が得られた。

- ・ 肝臓実質より腸内細菌科菌群が検出された個体は 14 頭 (15.1%) であり、うち、実質の左右葉共陽性となった検体では胆汁も陽性となり、高濃度実質汚染検体の探知のための胆汁スクリーニング検査の有用性が示唆された。

- ・ 肝臓実質に異常が認められた個体の胆汁はいずれも腸内細菌科菌群陰性であり、疾病探知にはと畜検査員による検査が重要な意義を有することが改めて示された。

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

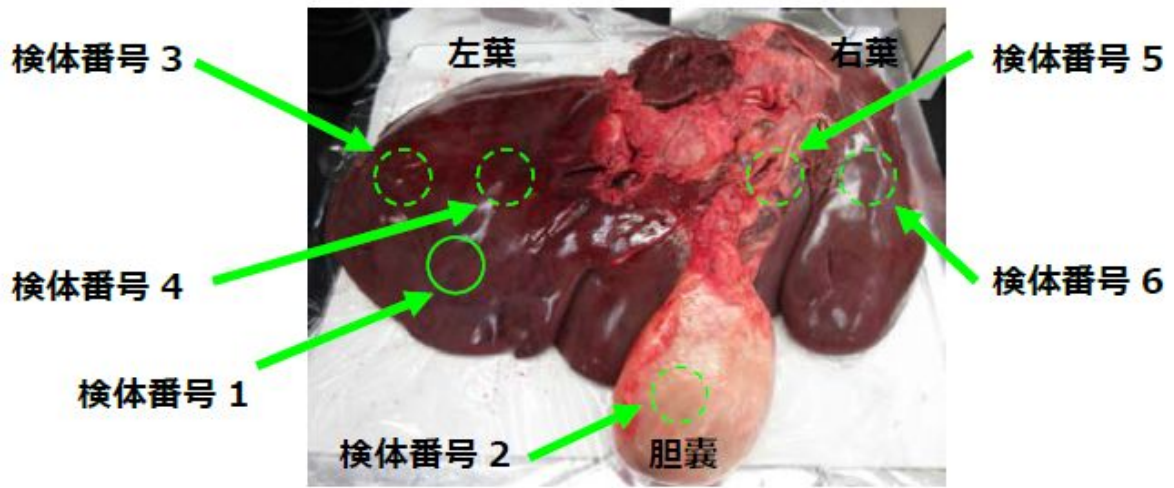


図1. 採材部位

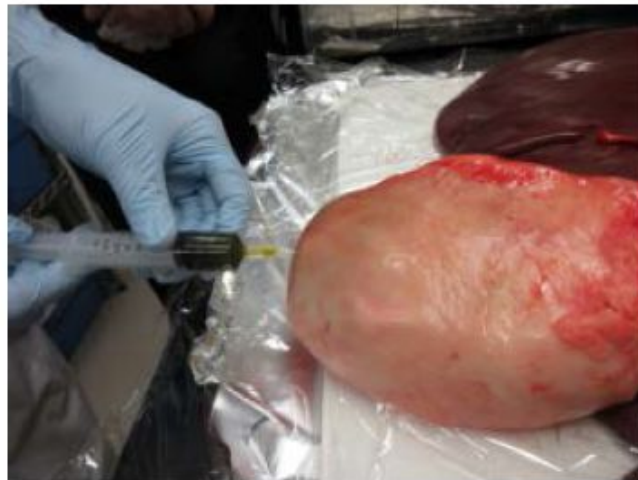
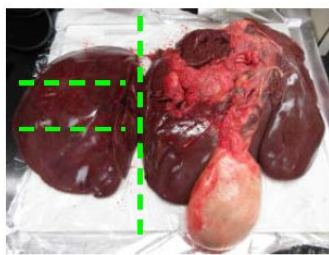
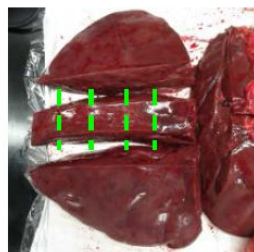


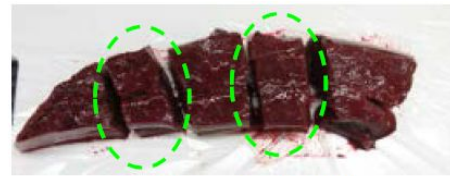
図2. 胆嚢内胆汁の採材



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

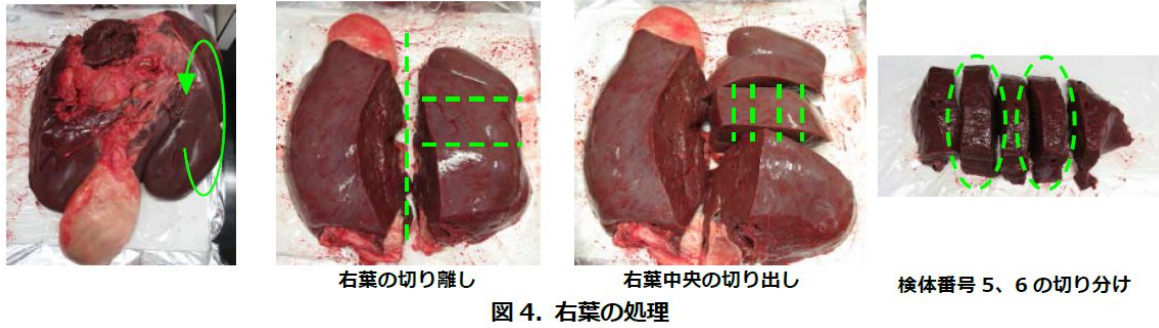


図 4. 右葉の処理

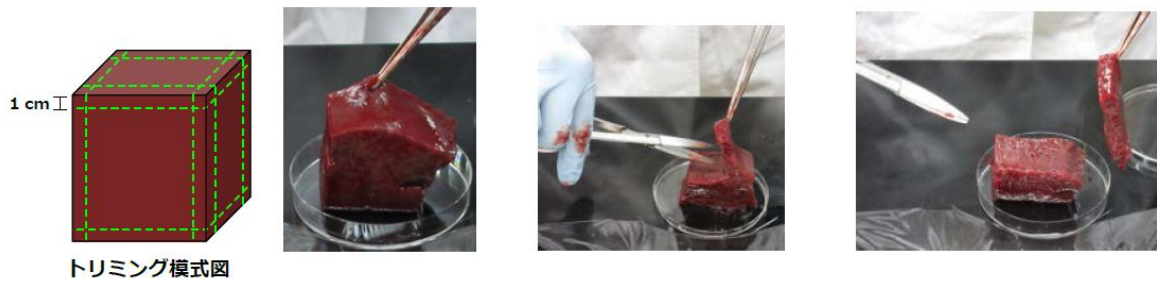


図 5. 検体表面のトリミング

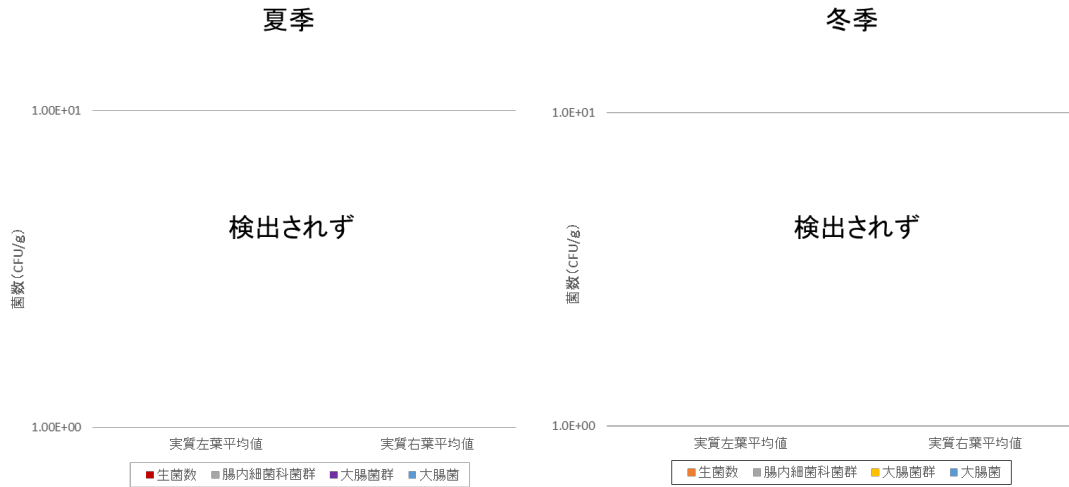


図 6. 自治体 A 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況 .

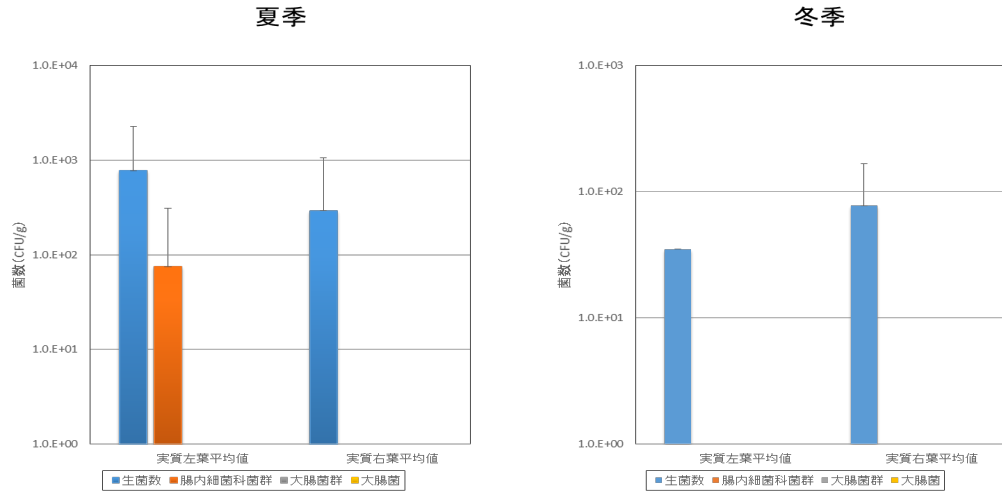


图 7. 自治体 B 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況 .

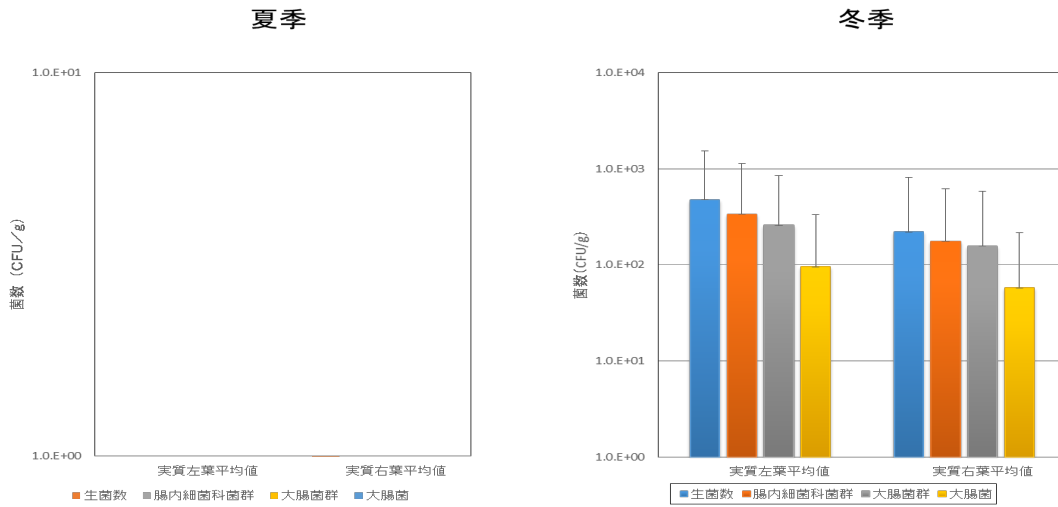


图 8. 自治体 C 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況 .

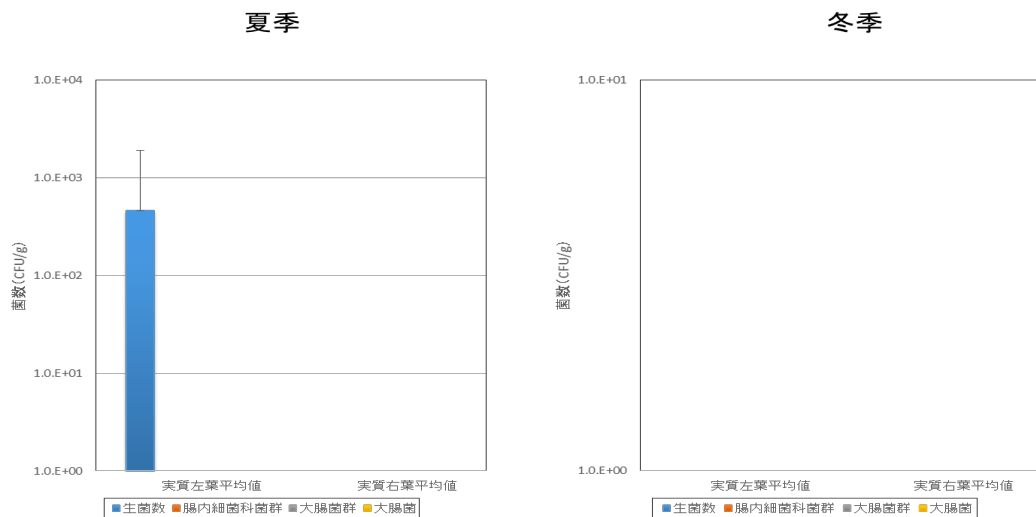


图 9. 自治体 D 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況 .

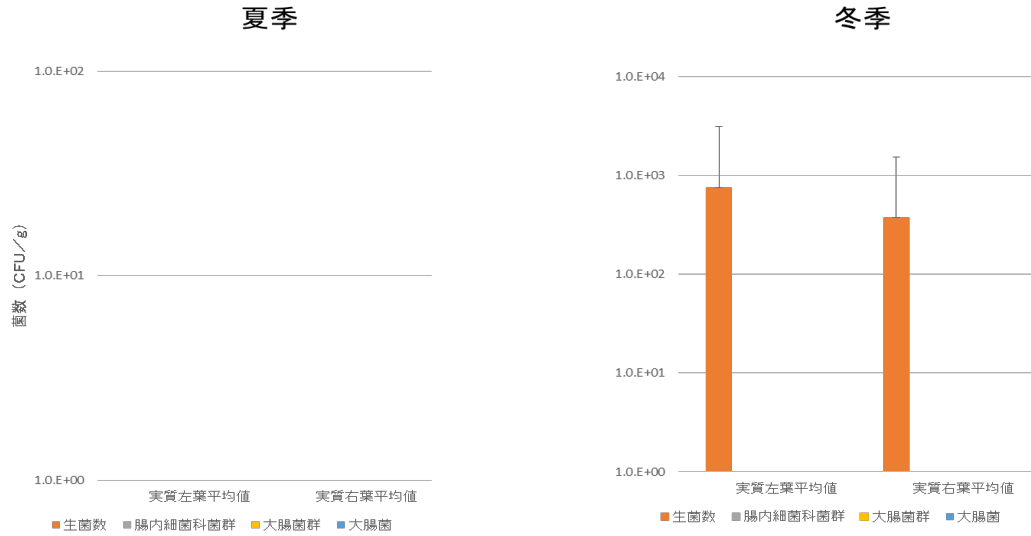


图 10. 自治体 E 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況。

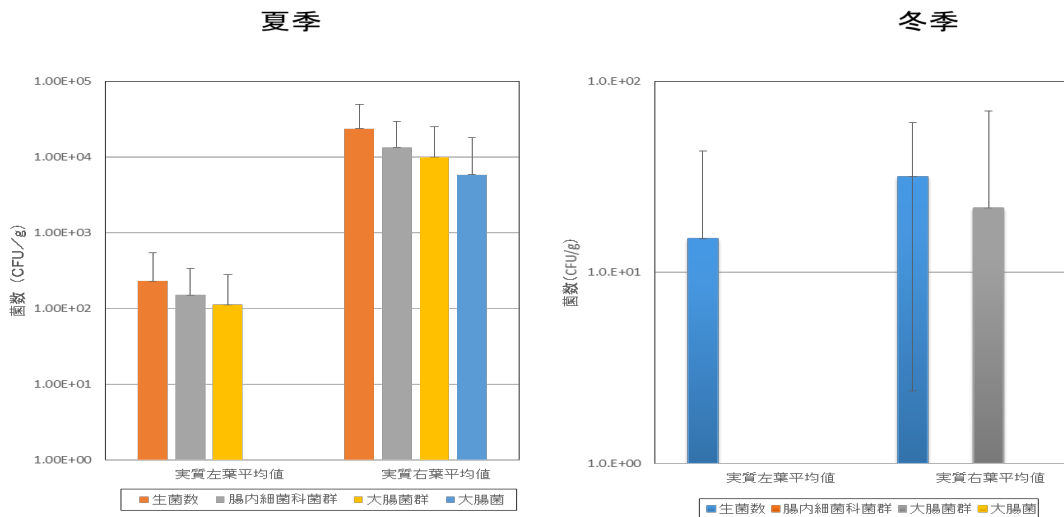


图 11. 自治体 F 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況。

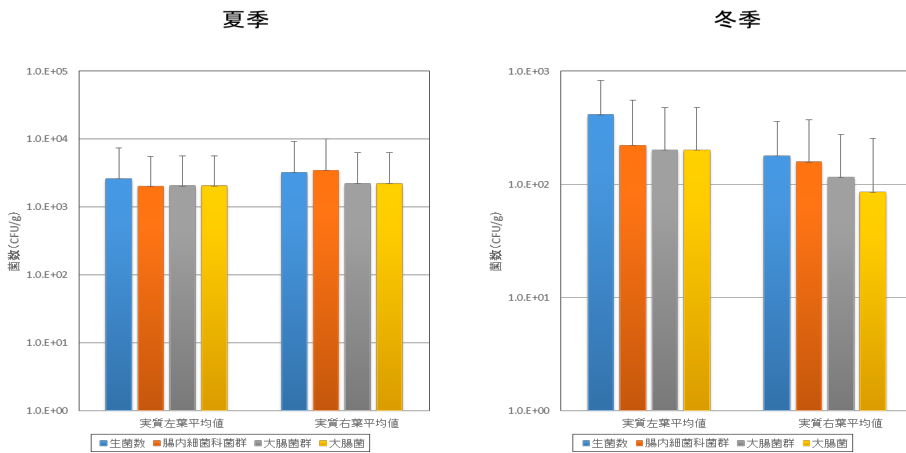


图 12. 自治体 G 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況。

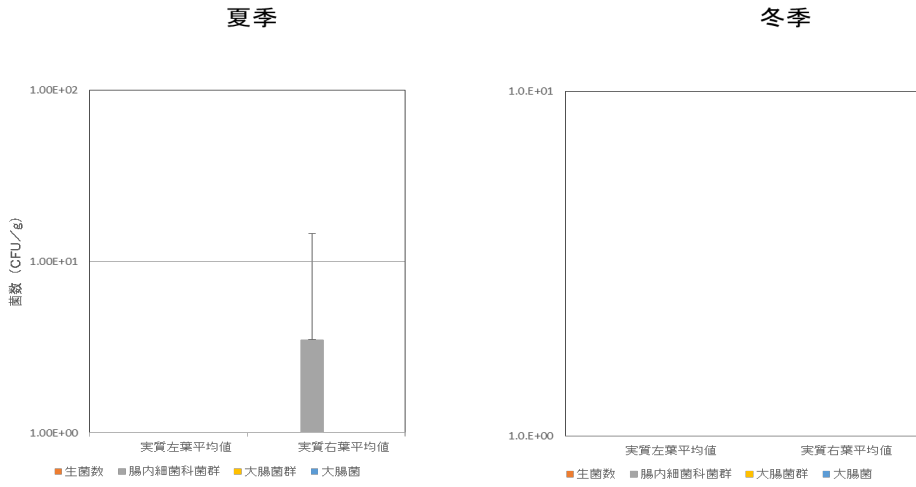


图 13. 自治体 H 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況.

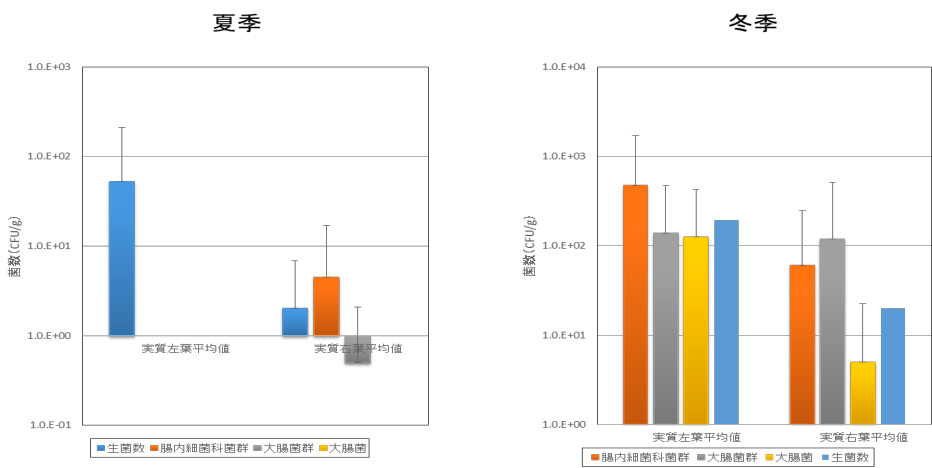


图 14. 自治体 I 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況.

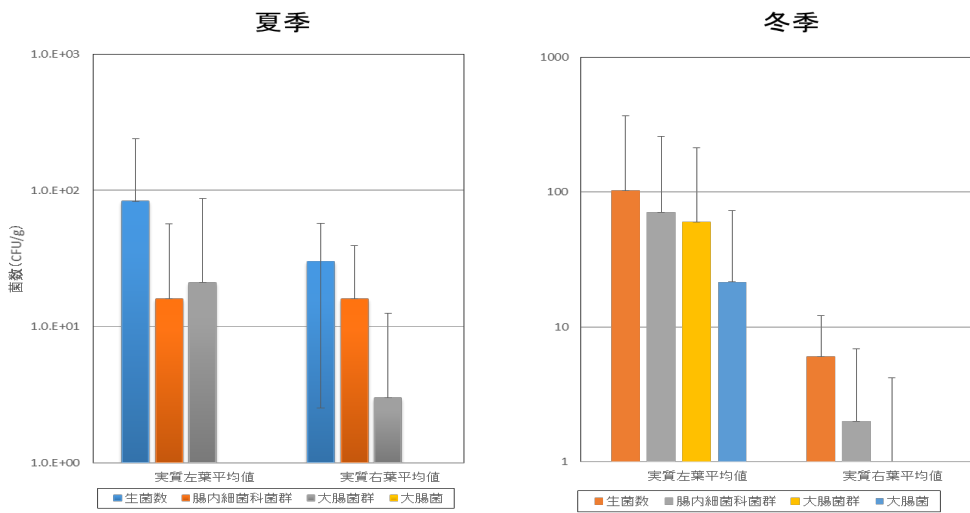
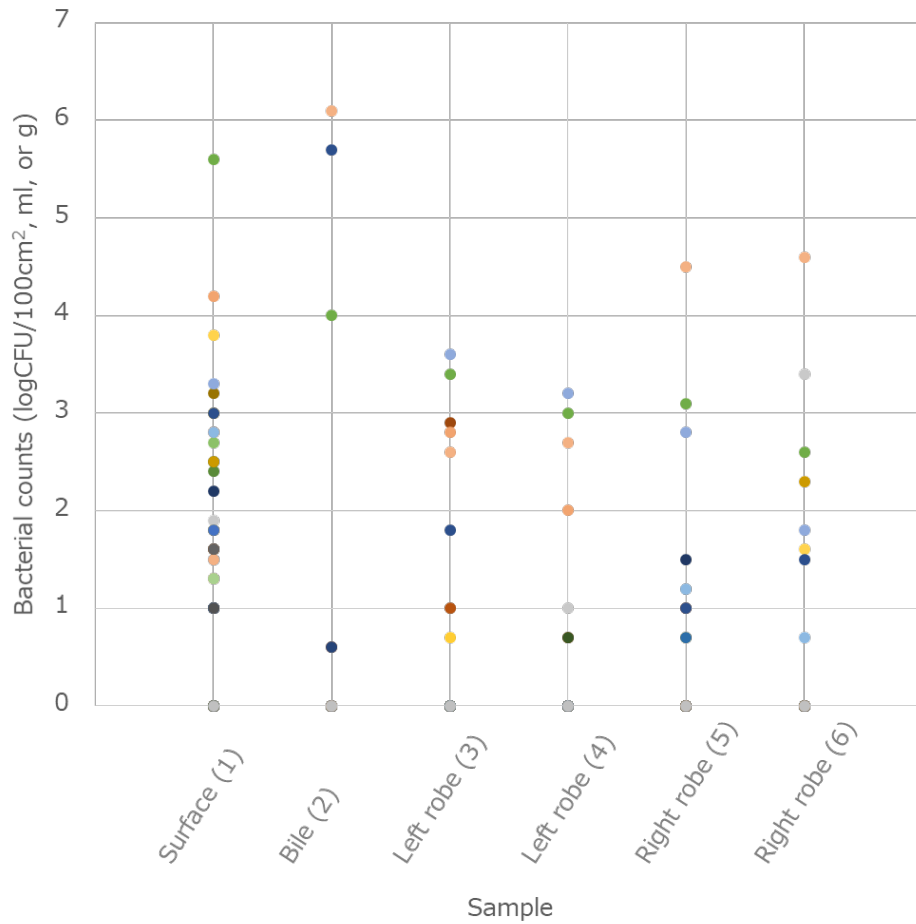


图 15. 自治体 J 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況

A



B

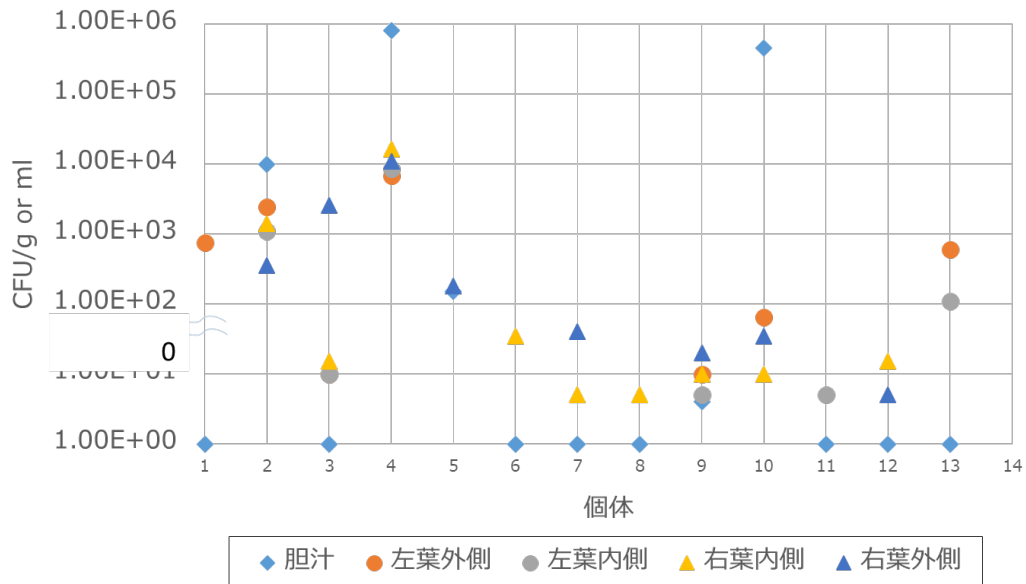


図 16. 健康牛の肝実質・胆汁等における腸内細菌科菌群の分布
 セクション A は部位別の分布動向を指し、採材対象個体ごとに異なる色で示す。セクション B は個体別の分布動向を指し、部位ごとに異なる色で示す。

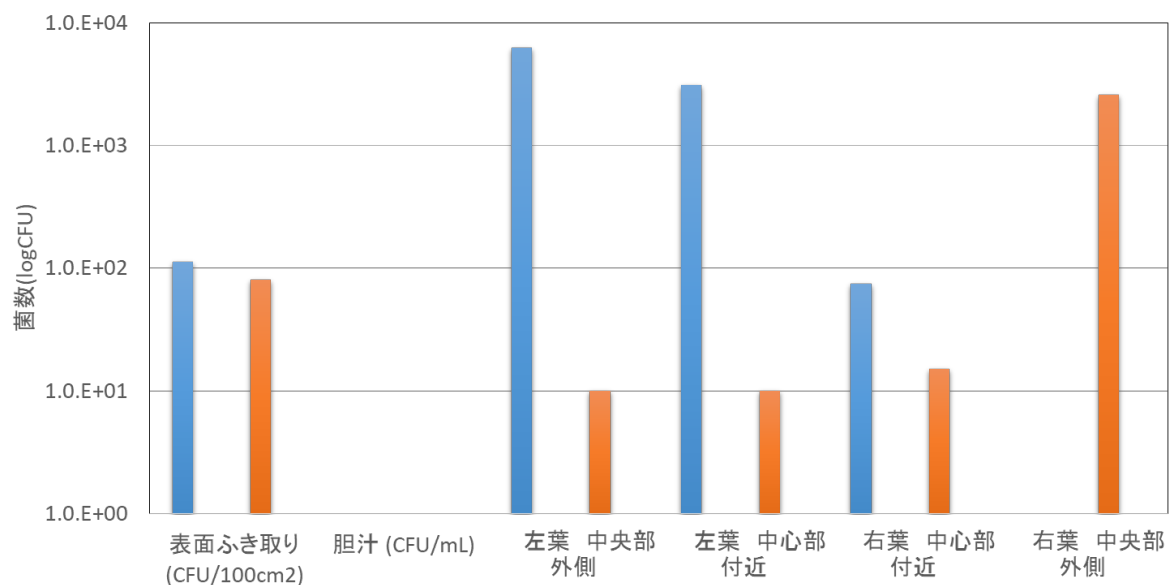


図 17.とちく検査により、異常が認められた牛肝臓等検体における指標菌の部位別検出状況。

青及びオレンジの検体は、自治体 C の夏季検体または自治体 F の夏季検体であり、それぞれ左葉または右葉に膿瘍が認められたものを指す。その他の疾病等の異常を認めた個体由来の検体についても同様に細菌検出試験に供したが、健常個体との明確な差異は認められなかった。

表 1 . 供試検体における部位別衛生指標菌の検出状況 (平均値)

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
表面拭取り (CFU/100cm ²)	2.90E+03	3.56E+02	2.58E+02	1.86E+02
胆嚢内胆汁 (CFU/ml)	6.40E+04	1.37E+04	1.12E+04	1.11E+04
実質左葉 外側 (CFU/g)	3.67E+02	1.35E+02	1.20E+02	1.14E+02
実質左葉 内側 (CFU/g)	1.64E+02	1.11E+02	1.11E+02	1.09E+02
実質右葉 外側 (CFU/g)	1.74E+02	1.84E+02	1.10E+02	1.09E+02
実質右葉 内側 (CFU/g)	7.24E+02	1.50E+02	1.04E+02	8.57E+01
実質左葉 (CFU/g)	2.66E+02	1.23E+02	1.15E+02	8.77E+01
実質右葉 (CFU/g)	4.49E+02	1.67E+02	1.08E+02	9.37E+01

表 2. 供試検体における施設別衛生指標菌の定量検出状況

一般細菌	自治体A(N=10)		自治体B(N=10)		自治体C(N=8)		自治体D(N=10)		自治体E(N=10)	
	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
部位										
表面拭取り(CFU/100cm ²)	10	1.30E+03	7	5.56E+02	8	1.70E+04	10	6.32E+03	10	3.30E+02
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	0	-	1	1.30E+00	1	7.00E-01	3	4.90E+04
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	3	7.70E+02	0	-	5	2.38E+02	1	7.50E+02
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	2	5.00E+00	0	-	4	4.00E+00	1	2.00E+00
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	3	5.95E+01	1	6.30E-01	2	1.50E+00	1	4.00E+00
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	3	2.48E+02	0	-	4	4.50E+00	1	3.70E+02
実質左葉(CFU/g)	0	-	5	3.88E+02	0	-	6	1.21E+02	2	3.80E+02
実質右葉(CFU/g)	0	-	3	1.54E+02	1	3.10E-01	5	3.00E+00	2	1.90E+02
部位										
自治体F(N=6)			自治体G(N=7)		自治体H(N=10)		自治体I(N=12)		自治体J(N=10)	
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	
表面拭取り(CFU/100cm ²)	6	2.58E+02	3	1.46E+02	7	2.73E+02	12	1.40E+03	9	3.20E+03
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	3	5.00E+01	1	1.00E-01	1	8.30E-02	2	4.60E+05
実質左葉 外側(CFU/g)	2	1.25E+01	2	9.71E+01	0	-	2	4.40E+02	5	9.90E+01
実質左葉 内側(CFU/g)	3	1.42E+01	2	3.71E+02	0	-	3	1.30E+02	5	2.30E+01
実質右葉 外側(CFU/g)	4	1.83E+01	2	1.66E+02	0	-	3	6.80E+01	7	8.50E+00
実質右葉 内側(CFU/g)	4	8.18E+03	2	3.71E+01	0	-	3	1.10E+01	7	1.30E+01
実質左葉(CFU/g)	4	1.33E+01	2	2.34E+02	0	-	3	2.80E+02	7	6.10E+01
実質右葉(CFU/g)	5	4.10E+03	2	1.01E+02	0	-	5	4.00E+01	8	1.10E+01
腸内細菌科菌群										
部位										
自治体A(N=10)			自治体B(N=10)		自治体C(N=8)		自治体D(N=10)		自治体E(N=10)	
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	
表面拭取り(CFU/100cm ²)	4	1.81E+02	3	6.00E+00	6	2.60E+01	9	2.67E+02	3	3.60E+01
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	0	-	0	-	1	4.00E-01	0	-
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	1	7.50E+01	0	-	1	5.00E-01	0	-
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉(CFU/g)	0	-	1	3.75E+01	0	-	1	2.50E-01	0	-
実質右葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
部位										
自治体F(N=6)			自治体G(N=7)		自治体H(N=10)		自治体I(N=12)		自治体J(N=10)	
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	
表面拭取り(CFU/100cm ²)	1	1.33E+01	2	9.70E+01	1	1.70E+01	5	7.30E+02	4	1.90E+03
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	3	5.00E+01	0	-	0	-	2	4.60E+04
実質左葉 外側(CFU/g)	1	1.67E+00	1	5.50E+01	0	-	1	3.40E+02	3	6.70E+01
実質左葉 内側(CFU/g)	1	1.67E+00	1	3.41E+01	0	-	1	1.30E+02	3	1.20E+01
実質右葉 外側(CFU/g)	1	2.50E+00	1	1.10E+01	1	3.50E+00	2	5.50E+01	4	4.00E+00
実質右葉 内側(CFU/g)	1	4.33E+02	2	5.11E+01	0	-	2	9.20E+00	3	6.00E+00
実質左葉(CFU/g)	1	1.67E+00	2	4.40E+01	0	-	1	2.40E+02	3	4.00E+01
実質右葉(CFU/g)	1	2.18E+02	3	3.10E+01	1	1.75E+00	2	3.20E+01	4	5.00E+00
大腸菌群										
部位										
自治体A(N=10)			自治体B(N=10)		自治体C(N=8)		自治体D(N=10)		自治体E(N=10)	
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	
表面拭取り(CFU/100cm ²)	3	1.22E+02	1	1.00E+00	3	1.10E+01	6	2.09E+02	2	1.30E+01
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
部位										
自治体F(N=6)			自治体G(N=7)		自治体H(N=10)		自治体I(N=12)		自治体J(N=10)	
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	
表面拭取り(CFU/100cm ²)	1	3.33E+00	2	7.10E+01	1	1.20E+01	7	5.70E+02	5	1.30E+03
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	3	5.00E+01	0	-	0	-	1	3.20E+04
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	1	3.90E+01	0	-	1	3.10E+02	2	5.90E+01
実質左葉 内側(CFU/g)	1	4.17E+00	1	4.35E+01	0	-	1	8.30E+01	1	1.20E+01
実質右葉 外側(CFU/g)	1	1.00E+01	1	1.62E+01	0	-	1	5.40E+01	1	1.00E+00
実質右葉 内側(CFU/g)	2	2.43E+02	2	3.45E+01	0	-	2	5.40E+00	1	1.50E+00
実質左葉(CFU/g)	1	2.08E+00	2	2.90E+01	0	-	1	2.00E+02	2	3.50E+01
実質右葉(CFU/g)	3	1.26E+02	3	3.42E+01	0	-	2	3.00E+01	2	1.30E+00
大腸菌										
部位										
自治体A(N=10)			自治体B(N=10)		自治体C(N=8)		自治体D(N=10)		自治体E(N=10)	
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	
表面拭取り(CFU/100cm ²)	3	1.22E+02	0	-	3	1.10E+01	6	1.89E+02	2	1.20E+01
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
部位										
自治体F(N=6)			自治体G(N=7)		自治体H(N=10)		自治体I(N=12)		自治体J(N=10)	
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	
表面拭取り(CFU/100cm ²)	0	-	0	-	0	-	5	2.60E+02	2	1.10E+03
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	2	4.29E+01	0	-	0	-	1	3.20E+04
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	1	3.93E+01	0	-	1	3.00E+02	1	1.60E+01
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	1	4.29E+01	0	-	1	7.50E+01	1	5.50E+00
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	1	1.57E+01	0	-	1	5.00E+01	0	-
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	1	5.00E+00	0	-
実質左葉(CFU/g)	0	-	2	4.11E+01	0	-	1	1.90E+02	1	1.10E+01
実質右葉(CFU/g)	0	-	1	7.86E+00	0	-	1	2.80E+01	0	-

表 3. 胆嚢を結紮・除去せずに一夜冷蔵輸送された牛肝実質（右葉）及び胆汁からの細菌検出状況

検体 種別	検体 番号	衛生指標菌数 (CFU/g または mL)			
		一般細菌数	腸内細菌科菌群数	大腸菌群数	大腸菌数
牛肝実質 (CFU/g)	1	2.36E+04	2.17E+04	2.02E+04	4.07E+03
	2	5.32E+04	5.47E+04	3.52E+05	5.83E+04
	3	4.22E+04	4.10E+04	4.22E+04	4.09E+04
	4	3.66E+04	3.51E+04	3.38E+04	3.96E+04
	5	3.51E+04	3.50E+04	3.45E+04	3.50E+04
	平均	3.81E+04	3.75E+04	9.65E+04	3.56E+04
	SD	1.08E+04	1.20E+04	1.43E+05	1.97E+04
牛胆汁 (CFU/ml)	6	8.40E+07	1.30E+06	8.70E+05	4.50E+05
	7	6.98E+07	9.75E+05	7.40E+05	2.85E+05
	8	1.19E+08	2.47E+06	1.12E+06	6.12E+05
	平均	9.09E+07	1.58E+06	9.10E+05	4.49E+05
	SD	2.53E+07	7.86E+05	1.93E+05	1.64E+05

牛肝実質（右葉）及び胆汁の菌数はいずれも採材直後の成績に比べ、顕著な増加を示す。