

平成30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

牛肝臓摘出後の適切な保管・衛生対策に関する研究

研究分担者 佐々木貴正
研究協力者 中山達哉

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：これまでの研究成果から、と畜場における腹腔からの肝臓摘出後、直ちに冷凍（-30℃）しない場合には、肝臓内部温度が体温（約39℃）から20℃まで低下するまで約4時間を要するため、肝臓内部に細菌が存在した場合には増殖する可能性があることが判明した。一方、肝臓内部の腸内細菌科菌群の高濃度汚染（10⁴CFU/g以上）と胆汁の腸内細菌科菌群汚染には高い相関が見られ、肝臓内部の高濃度汚染は胆汁検査によって推定できると考えられた。そこで、今年度は、肝臓の適切な冷凍条件、胆汁中のサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌0157の増殖性の検討、並びに胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群の定量解析を行い、肝臓摘出後の適切な保管・衛生対策について検討した。その結果、牛肝臓を冷凍保管（-30℃）した場合には、丸ごと、8（厚さ）X10X20cm、8（厚さ）X10X10cm又は5（厚さ）X10X10cmの内部温度が20℃以下になるまでそれぞれ2時間30分、2時間、1時間30分又は1時間以内で達成できることが判明した。また、と畜場において81頭の肝臓左葉最厚部を計測したところ、中央値は6.5cmで8cmを超えた検体は1検体のみであった。さらに、胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群汚染については、前年度の検体を含めた全139検体のうち13（9.4%）検体から当該菌が検出され、陽性検体の菌濃度はすべて10⁶CFU/mL以上であった。なお、これら陽性検体からは、サルモネラも志賀毒素産生性大腸菌0157は分離されなかった。最後に、胆汁にサルモネラ株4株又は志賀毒素産生性大腸菌0157株2株を接種し培養（38℃）すると5時間後には1000倍以上になることが明らかとなった。以上のことから、肝臓摘出後は肝臓内部の細菌増殖を抑制するために小分け後、直ちに冷凍することが望ましいこと、胆嚢内胆汁の腸内細菌科菌群汚染は低率である一方で、陽性検体における汚染菌濃度は高く容易に検査によって汚染の有無を判断できること、胆汁中にサルモネラ又は志賀毒素産生性大腸菌0157が存在した場合には速やかに増殖することが明らかとなった。

A. 研究目的

2012年7月1日以降、牛肝臓は生食用としての提供・販売が禁止されたが、生食に対する要望は依然として存在する。例えば、食中毒発生状況データでは、提供・販売が禁止された2012年では、牛レバ刺しを原因とするカンピロバクター一食中毒の報告が相次ぎ、7月には駆け込み需要と思われる食

中毒事件が6件（いずれもカンピロバクター一食中毒）報告され、さらに、その後一旦牛肝臓料理を原因とする食中毒事件は報告されなくなったものの、2015年以降は、炙りレバーや低温オイル煮といった加熱程度の低い牛肝臓料理が原因と推定される食中毒事件（カンピロバクター一食中毒及び腸管出血性大腸菌食中毒）が散発的に報告され

ている（表 1）。

生食用牛肝臓の販売・提供の再開に対する要望に応ずべく、その可能性を検討するためには、肝臓内部の細菌汚染実態を解明するとともに、摘出後における肝臓内部の細菌挙動を把握し、適切な殺菌及び増殖防止策を行う必要がある。

通常、腹腔から摘出された肝臓は、と畜検査員による検査終了後、内臓取扱業者に渡り、胆嚢を切除後、一定時間（半日～翌日）冷蔵室で保管され、と畜場から出荷される。この冷蔵室での保管については、摘出直後の肝臓内部温度は 38～40℃もあり、蛋白変性等の肝臓の化学的変化及び細菌増殖を抑制するために重要な工程であると考えられている。一方で、牛肝臓は、重量 6～8kg、厚み 5～10 cm（最厚部は右葉）もあるため、丸ごと冷蔵室に入れても、肝臓内部温度が細菌の増殖が抑制される温度（20℃）に低下するまで長時間を要すると考えられているが、その具体的な科学的データは存在せず、具体的な改善策は行われていない。肝臓内部の細菌汚染については、いくつかの報告がなされており、肝臓内部の腸内細菌科菌群の高濃度汚染と胆汁の腸内細菌科菌群汚染には高い相関性が見られ、胆汁の腸内細菌科菌群検査によって、高濃度汚染された肝臓を除去することが可能であると考えられるが、これについては胆汁の腸内細菌科菌群の詳細な汚染状況は調査されていない。さらに、肝臓内部汚染の実態は、肝臓内部に存在する胆管内に細菌が存在することに起因すると考えられることから、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌の胆汁における増殖性について確認しておく必要がある。そこで、今年度は肝

臓の適切な冷凍条件、胆汁中のサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の増殖性の検討、並びに胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群の定量解析を行った。

B. 研究方法

本研究は、1 と畜場の協力の下、2 年間に渡り試験を実施した。当該と畜場は、肥育牛及び交雑種のと殺・解体を実施している。なお、当該と畜場における牛肝臓の取り扱いについては、①肝臓摘出後、②と畜検査員によると畜検査後に、③フックに掛けられ、内臓取扱業者の加工室に運ばれる。そこで、④洗浄されたステンレス製作業台に置かれ、⑤胆嚢切除後に、⑥水切り台に肝臓を置き、⑦次亜塩素酸水で表面を洗浄後、⑧ビニール袋に入れられ、⑨氷水中に約 10 分間浸漬される。その後、⑩プラスチック製のトレイに他の臓器（心臓、尾、舌などの赤物と呼ばれる臓器）ともに入れられ⑪冷蔵室（設定値 4℃）で翌日まで保管される。その後、⑫翌日午前加工販売業者に出荷という経緯をたどる。

1. 胆汁及び肝臓の採取

胆汁採取は、⑤のステンレス製作業台のある作業室で待機し、肝臓から胆嚢を切除した直後に作業員から受け取り、その場で、19G 注射針を取り付けた 50mL シリンジを用いて胆汁を約 50mL 採取した。なお、注射針を突刺する部位はアルコール綿で予め消毒した。採取した胆汁は保冷剤を入れたクーラーボックスに入れ、当研究所に持ち帰り、3 時間以内に試験に供した。肝臓は、⑫の出荷時に内臓取扱業者の立ち合いの下で、採取し、クーラーボックスに入れ、当研究所に持ち帰り、3 時間以内に試験に供した。

2. 肝臓左葉最厚部の測定

81 頭の肝臓左葉部の最厚部の測定は、⑦の次亜塩素酸水洗浄直後に実施した。計測は、左葉最厚部の高さを、定規を用いて 0.5 cm 刻みで行った。

3. 肝臓内部の温度変化

出荷時の肝臓を当研究所に持ち帰り、丸ごと又は部分的に切断し、ウォーターバスで約 39°C まで温めたのち、深さ 4 cm の部分に温度ロガー（おんどとり）を取り付けて、冷凍庫（-30°C）に入れて温度変化を計測した。各条件下の試験を 3 回繰り返し、各条件下の平均温度で比較した。

4. 胆汁中におけるサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の増殖性

腸内細菌科菌群陰性の胆嚢内胆汁 5 検体を 1 プール検体として使用した。

胆汁にミューラー・ヒントン液体培地で 1 夜培養（37°C）した菌株（ヒト由来志賀毒素産生性大腸菌（STEC）0157 株 2 株、ヒト由来 *Salmonella* Typhimurium 株 2 株及びヒト由来 *S. Enteritidis* 株 2 株）を終濃度が約 2~3 log CFU/mL となるように胆汁に懸濁し、38°C で 5 時間培養した。なお、菌株未添加胆汁を陰性対照とした。菌数計測は、培養後の検体を PBS で 10 倍段階希釈し、3M 社製のペトリフィルム（EB プレート）に各濃度 2 枚に 1 mL ずつ添加し、培養後に集落数を計測した。なお、集落が観察された場合には、1 検体につき 4 集落を採取し、菌種の同定を行った。

5. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験

腸内細菌科菌群の定量試験については、PBS を用いて胆汁を 10 倍段階希釈し、3M

社製のペトリフィルム（EB プレート）に各濃度 2 枚に 1 mL ずつ添加し、培養後に集落数を計測した。また、前年度の検体を含め、腸内細菌科菌群陽性検体については、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験を行った。志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験は、胆汁を PBS で 10 倍希釈し、37°C にて約 24 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た。16,000 × g 以上で 5 分間遠心後、上清を取り除き、沈査に 100 μl 滅菌蒸留水を加えて、95°C 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 0157 特異的遺伝子について PCR 法により検出した。サルモネラの分離試験は、ISO 法に従った。

C. 結果

1. 肝臓左葉最厚部の測定

供試した肝臓 81 検体は、黒毛和種 64 頭及び交雑種（黒毛和種 × ホルスタイン）17 頭に由来し、と殺時の平均月齢は 30 か月（最小 25 か月、最大 37 か月）であった。最厚部の範囲は 5~8.5 cm であるが、8 割は 6~8 cm の間であった。8 cm 以上であったのは 5 頭で、そのうち 1 頭（27 か月の交雑種）の左葉最厚部は 8.5 cm であった（表 2）。

2. 肝臓内部の温度変化

摘出直後の肝臓内部温度は約 39°C であり、前年度の研究で牛肝臓の丸ごとを冷蔵保管（約 4°C）した場合には、肝臓内部温度が 20°C 以下（ミューラー・ヒントン液体培地及び胆汁中のサルモネラがほぼ増殖しなくなる温度）になるまでそれぞれ約 4 時間を必要とした。一方、今年度、冷蔵保管（-30°C）した場合には、丸ごとでは 2 時間

30分と約半分に短縮された。さらに、8（厚さ）X10X20cm、8（厚さ）X10X10cm 又は 5（厚さ）X10X20cm と小分けにした場合には、2時間、1時間半又は1時間以内で20℃以下にすることができた（図1）。

3. 胆汁中におけるサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌の増殖性

供試した6株とも5時間後には、3.3~3.8 log CFU 以上増加した（表3）。一方、菌株未添加胆汁からは培養5時間後でも菌の発育は認められなかった。

4. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験

前年度の検体を含めた全139検体のうち13(9.4%)検体から分離され、陽性検体の菌濃度はすべて10⁶CFU/mL以上と陽性検体の腸内細菌科菌群濃度は高かった（表4）。なお、これら陽性検体からは、増菌培養時に菌増殖が認められたものの、サルモネラでも志賀毒素産生性大腸菌0157でもなく、その他の腸内細菌科菌群であると考えられた。

D. 考察

本分担研究は、腹腔からの肝臓摘出後から出荷までの間における肝臓内部汚染の拡大防止に資する科学的根拠の集積を目的としている。と畜場では、腹腔から摘出された肝臓をと畜検査員が検査し、廃棄又は部分廃棄（病変部を削除）と判断する。その後は、内臓取扱業者によって、一旦冷蔵庫に保管され、半日~1日後にと畜場から出荷される。しかし、牛肝臓は、重量6~8kg、厚み5~10cmという実質臓器であり、さらに摘出直後の肝臓内部温度は約40℃であるため、冷蔵庫では急激な温度の低下を期

待することができず、肝臓内部に細菌汚染があった場合には増殖する可能性がある。

今回、肝臓を3つの大きさに分けて温度変化を計測したところ、予想どおり、小さなブロックにするほど、温度低下速度は速くなるが、その速度には底面の面積よりも厚さが大きく影響していることが明らかとなった。また、実行上、小さなブロックにするほど、切断面積が広くなるため細菌汚染を受ける可能性が高くなり、また、商品価値も低下する。今回の研究では、厚さを8cmにした場合、冷凍庫(-30℃)保管で20℃（サルモネラがミューラー・ヒントン液体培地及び胆汁で増殖がほぼ認められない(5時間培養でも10倍以下)温度)まで2時間以内に達成することができた。

肝臓左葉最厚部を計測したところ、8cmを超えたのは、1頭(1.2%)であり、この結果は、肥育牛及び交雑種の肝臓左葉を対象とした場合、右葉との接合面を切断することで、要件に適合できることを示している。

サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌0157は胆汁中で増殖できること、約1割の胆汁から高濃度の腸内細菌科菌群が分離されたことから、生体時の胆嚢内胆汁さらには肝臓内部にもこれら菌が存在することがあると考えられ、肝臓内部汚染の拡大防止には、肝臓から胆嚢を可能な限り早く衛生的に切除する必要がある。

以上のことから、生の品質を保持したまま肝臓内部の細菌を殺菌できる殺菌技術が確立できたとしても、肝臓内部汚染の拡大を防止するためには、胆嚢を可能な限り早く肝臓から切除し、さらに、肝臓丸ごとでなく、小分け後に冷凍する必要がある。

E. 結論

- ・ 139 頭中 9.4% (13 頭) の胆嚢内胆汁において、高濃度 (10^6 CFU/mL 以上) の腸内細菌科菌群が検出された。
- ・ これら陽性検体からサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 は検出されなかった。
- ・ サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 は胆汁で増殖可能であった。
- ・ 腹腔から摘出後の肝臓は、細菌汚染拡大防止のため、胆嚢を速やかに切除し、小分けした上で、冷凍することが望ましい。

F. 研究発表

5. 論文発表

なし

6. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 2012～2018年間の牛肝臓料理喫食による食中毒事件（届出）

年	発生日	発生場所	原因食品		施設	摂食者数	患者数	死者数
2012	1月23日	愛知県	牛レバ刺しを含む焼肉料理	カンピロバクター	飲食店	3	3	0
	1月29日	京都府	牛レバー刺しを含む肉料理	カンピロバクター	飲食店	22	9	0
	2月28日	宮城県	レバ刺し(推定)	カンピロバクター	飲食店	10	5	0
	4月12日	東京都	会食料理 (焼肉・牛レバー刺し等)	カンピロバクター	飲食店	15	11	0
	6月30日	東京都	牛レバ刺しを含む食事	カンピロバクター	飲食店	5	5	0
	7月1日	秋田県	牛レバー刺し (6/28 飲食店の食事)	カンピロバクター	飲食店	10	8	0
	7月1日	東京都	6月28日の食事 (牛レバ刺しを含む)	カンピロバクター	飲食店	6	3	0
	7月1日	東京都	牛レバ刺しを含む会食料理	カンピロバクター	飲食店	4	4	0
	7月1日	東京都	牛レバー刺し	カンピロバクター	飲食店	2	2	0
	7月1日	島根県	原因施設で提供された食事 (レバ刺し・焼肉を含む料理)	カンピロバクター	飲食店	不明	8	0
	7月2日	東京都	食事(牛レバー刺しを含む)	カンピロバクター	飲食店	4	3	0
	8月1日	広島県	7月30日に提供した生レバー (推定)	カンピロバクター	飲食店	2	1	0
2013	届出なし							
2014	届出なし							
2015	6月6日	茨城県	不明(6月4日に提供された 牛炙りレバ刺しを含む食事)	カンピロバクター	飲食店	6	5	0
	12月23日	大阪府	牛レバー	腸管出血性大腸菌(VT産生)	家庭	3	2	0
	9月22日	奈良県	炙りレバー	腸管出血性大腸菌(VT産生)	飲食店	13	4	0
2016	10月31日	富山県	牛レバーの低温オイル煮	カンピロバクター	飲食店	16	5	0
2017	届出なし							
2018	2月21日	神奈川県	炙りレバー	カンピロバクター	飲食店	3	3	0

表2 牛肝臓81検体の左葉最厚部の分布

肝臓左葉最厚部(cm)				
$5 \leq x < 6$	$6 \leq x < 7$	$7 \leq x < 8$	$x \geq 8$	Total
13	34	29	5	81

平均月齢:30か月(最小:25か月、最大37か月)

品種:黒毛和種64頭、交雑種17頭

図1 肝臓内部の温度変化 (-30°C冷凍庫)

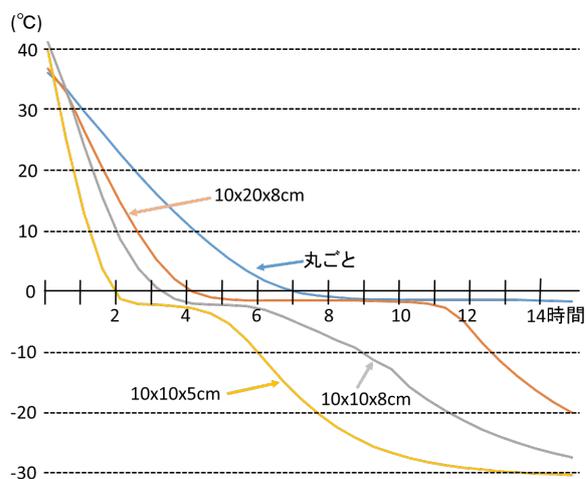


表3 胆汁中におけるサルモネラ及び STEC の増殖性 (log CFU/ml)

菌種	株	培養時間(38°C)	
		0 時間	5 時間
STEC	O157-1	2.6	6.4
STEC	O157-2	2.4	6.0
<i>S. Typhimurium</i>	T4-3	3.1	6.4
<i>S. Typhimurium</i>	T4-34	3.0	6.2
<i>S. Enteritidis</i>	E9-2	3.3	6.6
<i>S. Enteritidis</i>	E9-3	2.8	6.1

表4 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 O157 の分離結果

採取年月日	月齢	品種	性別	腸内細菌科菌群 (CFU/mL)	<i>Salmonella</i>	O157
2017/11/8	29	黒毛和種	去勢	2.5×10^6	-	-
2017/11/8	30	黒毛和種	去勢	7.9×10^6	-	-
2017/11/15	34	交雑種	去勢	1.4×10^7	-	-
2017/11/15	28	黒毛和種	去勢	2.6×10^7	-	-
2017/11/20	32	黒毛和種	雌	3.6×10^6	-	-
2018/7/9	30	黒毛和種	去勢	1.3×10^7	-	-
2018/7/26	30	黒毛和種	雌	2.4×10^6	-	-
2018/7/26	27	黒毛和種	雌	1.5×10^7	-	-
2018/11/2	35	黒毛和種	雌	5.5×10^6	-	-
2018/11/2	36	黒毛和種	雌	3.1×10^7	-	-
2018/11/19	33	黒毛和種	去勢	5.7×10^6	-	-
2018/12/6	30	黒毛和種	去勢	4.5×10^6	-	-
2018/12/25	31	黒毛和種	雌	6.6×10^7	-	-