

令和元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）
「野生鳥獣由来食肉の安全性確保とリスク管理のための研究」
分担研究報告書

わが国に分布する旋毛虫 *Trichinella* T9 の殺滅に有効な加熱条件の予備的検討

分担研究者 杉山 広 （国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者 森嶋康之 （国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者 村上正樹 （国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者 常盤俊大 （日本獣医生命科学大学獣医学部）

研究要旨

わが国で発生したクマ肉喫食による旋毛虫食中毒の病因 *Trichinella* T9 を用いて、本虫の感染性を消失させる加熱条件を、マウスモデルを用いた感染試験で検討した。厚労省が野生鳥獣の加熱に求める条件（75 で1分以上）ならびに、それと同等とされる70 で3分、65 で15分、さらに厚労省の条件を上回る75 で2分との4条件で旋毛虫 T9 の幼虫を処理した。その結果、70 で3分および65 で15分の加熱で、本虫のマウスへの感染性が消失した。一方、75 で1分（および2分）の加熱では、本虫のマウスへの感染性が完全には消失しなかった。旋毛虫食中毒の予防に関する加熱条件のさらなる検討が必要と思われる。

A. 研究目的

野生鳥獣肉の喫食を原因とする食中毒の発生を予防するために、厚労省では「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針（ガイドライン）について」（食安発1114第1号・2014年11月14日）を作成公開した。この中で野生鳥獣肉を喫食する際には、中心部の温度を75以上にして、1分以上加熱するように、またはこれと同等以上の効力を有する条件で加熱するように、指導している。

最近、わが国ではクマ肉を原因とする旋毛虫食中毒の集団事例が、短期間のうちに3度発生した（2016年12月（茨城県）2018年5月および2019年11月（北海道））。これらの集団食中毒事例では、いずれも喫食前のクマ肉に加熱が施

されていた。この事実から、旋毛虫は加熱に対してある程度の耐性を有するのではないかと考えられた。そこで本研究では、厚労省のガイドラインに則した加熱条件での実験をマウスモデルで実施し、旋毛虫による食中毒の発生予防に有効な加熱条件を改めて検討した。

B. 研究方法

当研究室において、マウス（ddy系，雄）で実験室内継代している旋毛虫 *Trichinella* T9 を用いて、検討を進めた（1974年の集団人体感染事例の原因クマ肉に由来する虫体）。まず実験室で継代している感染マウス5匹を剖検し、その筋肉をペプシン塩酸液（ペプシン、半井化学、1:10,000が1%、および塩酸が1%）

で人工消化して、本虫の幼虫を回収した。得られた幼虫は約 400 隻ずつ PCR 用のプラスチックチューブ (Thin-wall、0.6ml ; 以下、チューブ) 20 本に分配し、さらに各チューブに生理食塩水 (以下、生食水) を加えて、チューブ内の液量を 0.4ml にそろえた。その上で、計 20 本のチューブを 4 本ずつ、以下の 5 群に分け、処理を施した。

群 1、75 で 2 分

群 2、75 で 1 分

群 3、70 で 3 分

群 4、65 で 15 分

群 5、未処理

各群の加熱処理条件の設定に当たっては、「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針 (ガイドライン) について」(厚労省、2014) を参照した。本ガイドラインでは、野生鳥獣肉の喫食による食中毒の発生を防止するため、肉の加熱が有効と記載されており、その条件として、肉の中心温度が 75 以上で 1 分以上と特定されていた。また、「食品の安全管理における Q&A」(厚労省) では、この 75 で 1 分と同等の加熱条件として、70 で 3 分、69 で 4 分、68 で 5 分、67 で 8 分、66 で 11 分、65 で 15 分が例示されていた。本実験の群 3 (70 で 3 分) および群 4 (65 で 15 分) では、この代替条件で加熱処理した。また群 1 では、上記ガイドラインで示されている 75 で 1 分 (群 2) との加熱時間を、2 倍の 2 分に延長することで、旋毛虫 T9 幼虫の確実な殺滅を期待した。また未処理の群を陽性対照として設定した (群 5)。

このような加熱条件等で処理したチューブは、処理後に速やかにクラッシュアイズを入れた容器に移した。そして幼虫を含む懸濁液を、先端部にシリコンチューブを装着させたパストツールピペットを用いて、各マウスの胃噴門部に注入した (マウス 1 頭当たりの投与数は約 400 隻、上述)。投与マウスは経口投与後 65 ~ 73 日に剖検し、全身の骨格筋 (横隔膜および舌を含む) の分離に努めた後、筋肉 (一部は骨格に付着したまま) を個別別一括してプラスチック容器 (500 ミリリットル) に入れ、20 倍量のペプシン塩酸液にて、37 で 60 分間、振盪消化した。消化された筋肉は、目開きが 300 マイクロメートルの金属メッシュで濾過して骨片などの残渣を取り除き、濾液をガラス製の円錐型液量計 (1.5 リットル) に移し、1 リットルの生食水を加えて、30 分間静置した。この上清を吸引除去し、除去と同量の生食水を加える洗浄操作を、上清が清澄となるまで 4 回繰り返した。そして、沈査をプラスチックシャーレ (径 9 cm) に移し、実体顕微鏡下に観察して、幼虫をパストツールピペットで回収した。

回収された幼虫は、全数を 500 ミリリットルの容器 (プラスチック製、蓋付き) に移し、生食水を加えて液量を 200 ミリリットルとした。これをよく攪拌した後、2 ミリリットルをシャーレに移し、実体顕微鏡下に全幼虫を計数した。この作業を 4 回繰り返した (2 ミリリットルの幼虫含有液を別途に 4 個調製して、各溶液を計数)。そして、得られた各数値を 100 倍することで、各マウス個体に寄生する全虫体数 (平均および標準偏差) を

算出した。

上述の人工消化と幼虫回収に関しては、食品衛生検査指針（日本食品衛生協会、2018）を主な参考資料とした。また加熱のための具体的な手法に関しては、指定温度に至るまでの加熱時間を可能な限り短縮するため、100 に予め設定したヒートブロック（ヒートブロック1）で、チューブを先に指定温度まで予備加熱し、その後、予め指定温度となるように設定した別のヒートブロック（ヒートブロック2）にチューブを速やかに移して、高温耐性試験が実施できる実験系を構築した（補遺参照）。

C. 研究結果

各群の陽性マウスの数および陽性マウスからの検出虫体数は、表1および図1に示した。

まず、75 で1分の加熱を行った場合（群2）実験に用いたマウス4頭のうち1頭から幼虫が検出された。マウスへの感染性が完全に失われていないことがわかった。ただし、この陽性個体からの幼虫検出数は、未処理マウス（群5）からの幼虫検出数の4割以下にとどまった。75 で2分の加熱（群1）を行ったマウス4頭でも、1頭から幼虫が検出された。ただし、この陽性個体の幼虫検出数は、75 で1分処理のマウス（群2の陽性マウス、1頭）からの幼虫検出数より少なかった。

しかし70 で3分（群3）および65 で15分（群4）の加熱を施した場合、マウスへの感染性は完全に消失し、虫体陽性のマウスは全く認められなかった。

なお未処理群（群5）では、実験に用

いたマウス4頭のすべてから幼虫が回収され、幼虫検出数はマウス1頭当たり、平均9,680隻（最小5,394隻、最大16,663隻）となった。

D. 考察

厚労省は「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針（ガイドライン）について」（食安発1114第1号・2014年11月14日）を発出し、野生鳥獣肉を喫食する場合は、75 で1分以上、またはこれと同等以上の効力を有する手法によって、十分加熱するよう指導している。しかし、2016年には茨城県で、2018年と2019年には北海道で、クマ肉の喫食による旋毛虫感染の人体集団事例が発生した。これらの事例の発生を受け、厚労省は旋毛虫食中毒の発生予防を徹底するため、2016年には「クマ肉による旋毛虫（トリヒナ）食中毒事案について」（生食監発1223第1号・2016年12月23日）を、また2019年には「野生鳥獣肉による食中毒防止の徹底について」（薬生食監発1220第2号・2019年12月20日）を発出した。これらの通知においても、2014年に発出されたガイドラインと同様に、75 で1分以上、もしくは同等の効力を有する手法での加熱を行うように指導している。

上述の集団感染事例においては、クマ肉はいずれも加熱処理されていたことが、その後の聞き取り調査で明らかとなった。例えば2016年の事例では、オープンにてクマ肉の表面を220~250 で2~3分加熱し、さらにアルミホイルに包んで5~10分蒸らしていた。2018年の事例では、クマ肉をローストし、あるいは揚げ物（カツ）にしてから喫食していた。さら

に2019年の事例でも、ローストしてから喫食していた。これらの事実から、旋毛虫は高温処理に対して（ある程度の）耐性を持つと考えられた。

今回の実験の結果、旋毛虫 *Trichinella* T9の幼虫を70 で3分および65 で15分加熱すれば、マウスへの感染性は消失することが分かった。しかしながら、75 での加熱では、1分だけでなく、その2倍の2分の加熱でも、マウスへの感染性は完全に消失しなかった。旋毛虫 *Trichinella* T9の感染性を完全に失活させる加熱条件に関しては、さらなる検討が必要と考えられた。

旋毛虫の生活環を鑑みて、この結果をさらに考察したい。今回は400隻の幼虫を各1匹ずつのマウスに経口投与した。投与した旋毛虫の雌・雄が同数と仮定すれば、腸管に定着した最大400隻の幼虫は、200隻ずつの雄成虫および雌成虫に発育したと考えられる。さらに、雌成虫が雄成虫と交接し、その結果として、1隻の雌成虫が生涯に1,000隻の幼虫を産出したと仮定すれば、今回の実験系では、計算上、 $200 \times 1,000 = 200,000$ （20万）隻の幼虫が筋肉に移行したことになる。実際の回収幼虫数は、群5（陽性対照）の結果から、平均9,680隻であり、計算上の数値の約5%となった。

一方、筋肉からの幼虫回収が陰性となった群3、群4では、投与した幼虫が腸管内に定着できなかった、成虫に発育できなかった、成虫に発育したが交接しなかった、成虫に発育して交接したが産子しなかった、などの可能性（およびその組み合わせ）が想定され、その結果として筋肉からの幼虫回収が陰性になったと

考えられた。逆に言えば、群1（75 で1分）および群2（75 で2分）では、加熱処理後に投与した幼虫のうち、生存して腸管に定着したものが含まれ、その結果、筋肉に移行する幼虫が産出されたと考えられた。この筋肉内の幼虫は、旋毛虫食中毒の原因となり得る発育状態と同等とされた。

今回の実験結果から、高温であっても処理時間が短いと、感染性が残存すると想像された。今後は、1分あるいはそれ以下の短時間の処理でも、感染性が完全に消失する温度条件を検討したいと考えている。また、処理温度が低くても（例えば65未満）、処理時間が長ければ、感染性は消失すると想像され、その検証が必要と思われた。このような検討を通じて、旋毛虫食中毒の予防に有効な加熱条件について、知見を集積したいと考えている。

補遺）旋毛虫の高温耐性試験を実施するための温度設定条件の予備的検討

1. 方法

旋毛虫 *Trichinella* T9における高温耐性の評価を行うにあたり、指定温度に至るまでの加熱時間を可能な限り短くするため、100 に設定したヒートブロック（ヒートブロック1）でチューブを指定温度まで予備加熱した後、予め指定温度となるように設定した別のヒートブロック（ヒートブロック2）にチューブを速やかに移して高温耐性試験を実施する実験系を構築した。まず、ヒートブロック1を100 に設定し、指定温度の65、70、75 に達するまでの時間を調べた。

次に、ヒートブロック 2 を指定温度に保つための設定温度を検討した。ヒートブロック 1 には Takara DNA Thermal Cycler 480 (Takara Bio, Shiga, Japan) を、ヒートブロック 2 には Nissin Thermo Block ND-M01 (Nissin-rika, Saitama, Japan) を用い、温度の測定と記録は、Thermo Recorder TR-52i および TR-50U2 (T&D, Nagano, Japan) を用いた。旋毛虫 *Trichinella* T9 の加熱試験では、生食水 0.4ml に旋毛虫幼虫 400 隻を懸濁したチューブを加熱することから、これらの予備実験では、同様のチューブに 0.4 ミリリットルの生食水を入れて検討した。

2. 結果

(1) ヒートブロック 1 を 100 に設定した場合の温度上昇実験

ヒートブロック 1 を 100 に設定した場合、チューブ内の生食水が 65、70、75 に到達する平均時間は、それぞれ 21 秒、24 秒、28 秒であった。6 次式近似曲線によって作成した温度上昇曲線を図 2 に示す。

(2) 3 種類の指定温度に保つためのヒートブロック 2 の設定温度の検討

ヒートブロック 2 の温度を 65、70、75 に保つために必要な設定温度は、本機ではそれぞれ 65.5、71.1、76.0 であることがわかった。

ヒートブロック 2 だけを用いてチューブ内の生食水を加熱した場合、液温が 75 に到達するまでに、3 分以上の時間を要した (図 3)。上述のように、ヒートブロック 1 を用いた予備加熱を行うこと

で、75 に到達するまでの時間は 28 秒に短縮され、75 に達するまでの温度帯での加熱の影響を、より少なくできたと考えている。

従って、例えば今回の本実験 (群 1) では、旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫 400 隻を生食水 (0.4 ミリリットル) に懸濁させたチューブを、まずヒートブロック 1 で 28 秒予備加熱して液温を 75 に到達させた。その直後にヒートブロック 2 (75) に移して 1 分間処理するという方法を用いることで、75 で 1 分の加熱という条件にした。

E. 結論

わが国で発生したクマ肉喫食による旋毛虫食中毒の病因 *Trichinella* T9 を用いて、本虫の感染性を消失させる加熱条件を、マウスモデルを用いた感染試験で検討した。その結果、70 で 3 分および 65 で 15 分の加熱で、マウスへの感染性が消失した。一方、75 で 1 分 (および 2 分) の加熱では、マウスへの感染性が完全には消失しなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表; 2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

1. 特許取得; 2. 実用新案登録

なし

表1 旋毛虫 *Trichinella* T9 の高温耐性試験の結果

群	幼虫処理		動物数		感染の 期間(日)	検出虫体数 (陽性個体の1頭平均 ± sd)
	温度()	時間(分)	投与	陽性		
1	75	2	4	1	73	1738 ± 114
2	75	1	4	1	66	2013 ± 353
3	70	3	4	0	73	0
4	65	15	4(3)*	0	65	0
5	無処理	無処理	4	4	72	9680 ± 4331

* : 4頭に投与したが、飼育途中で1頭が食殺され、剖検時には3頭となった。

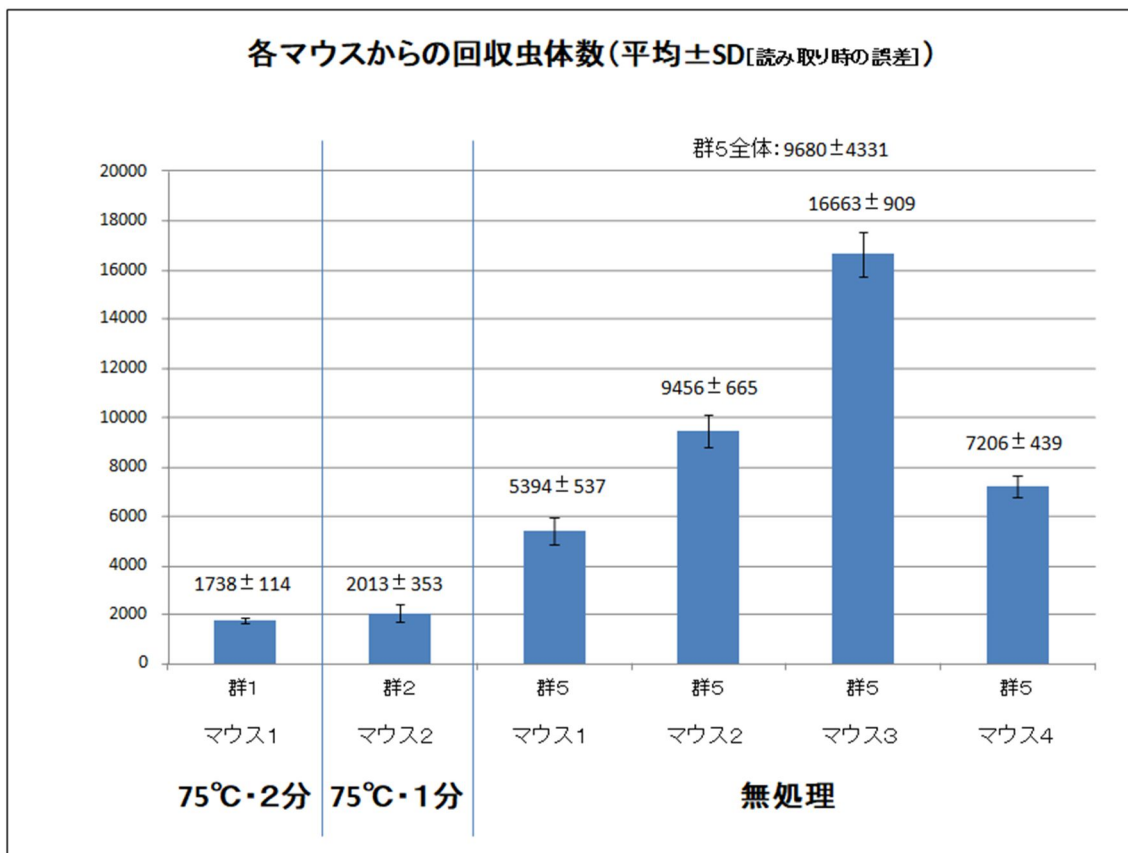


図1 旋毛虫 *Trichinella* T9 の高温耐性試験の結果

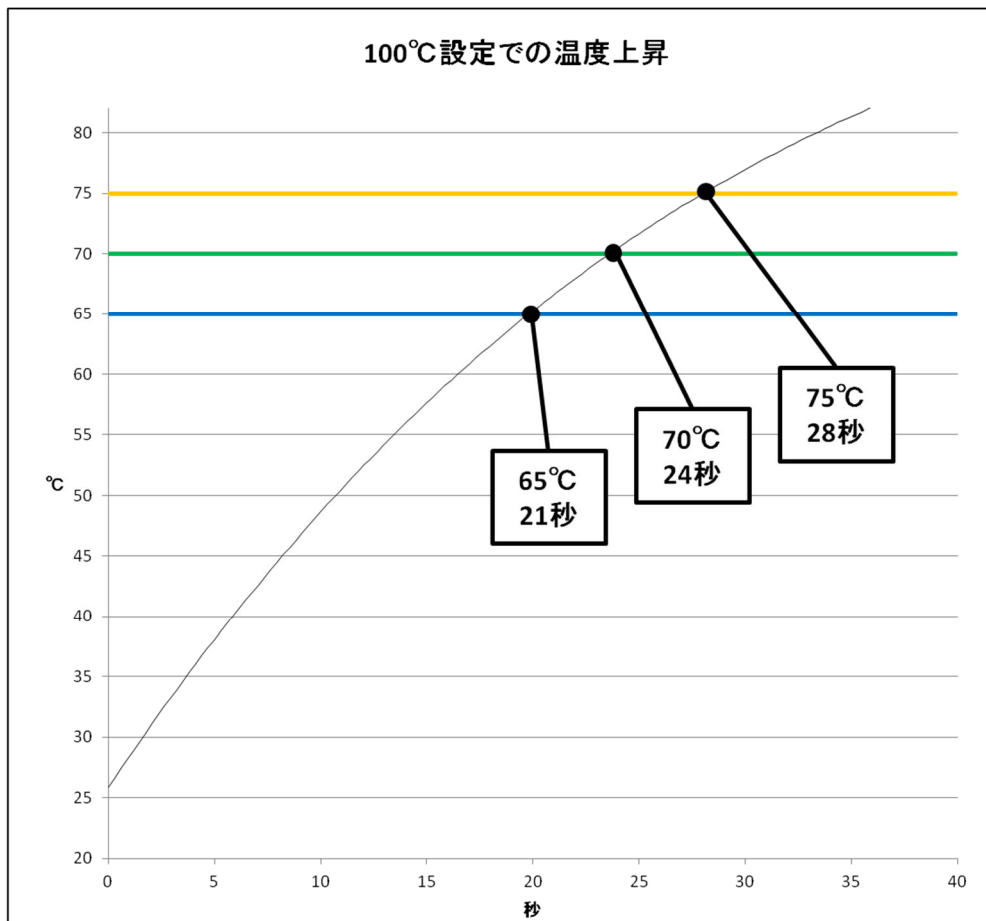


図2 100 設定での温度上昇曲線（6次式近似曲線により作成）

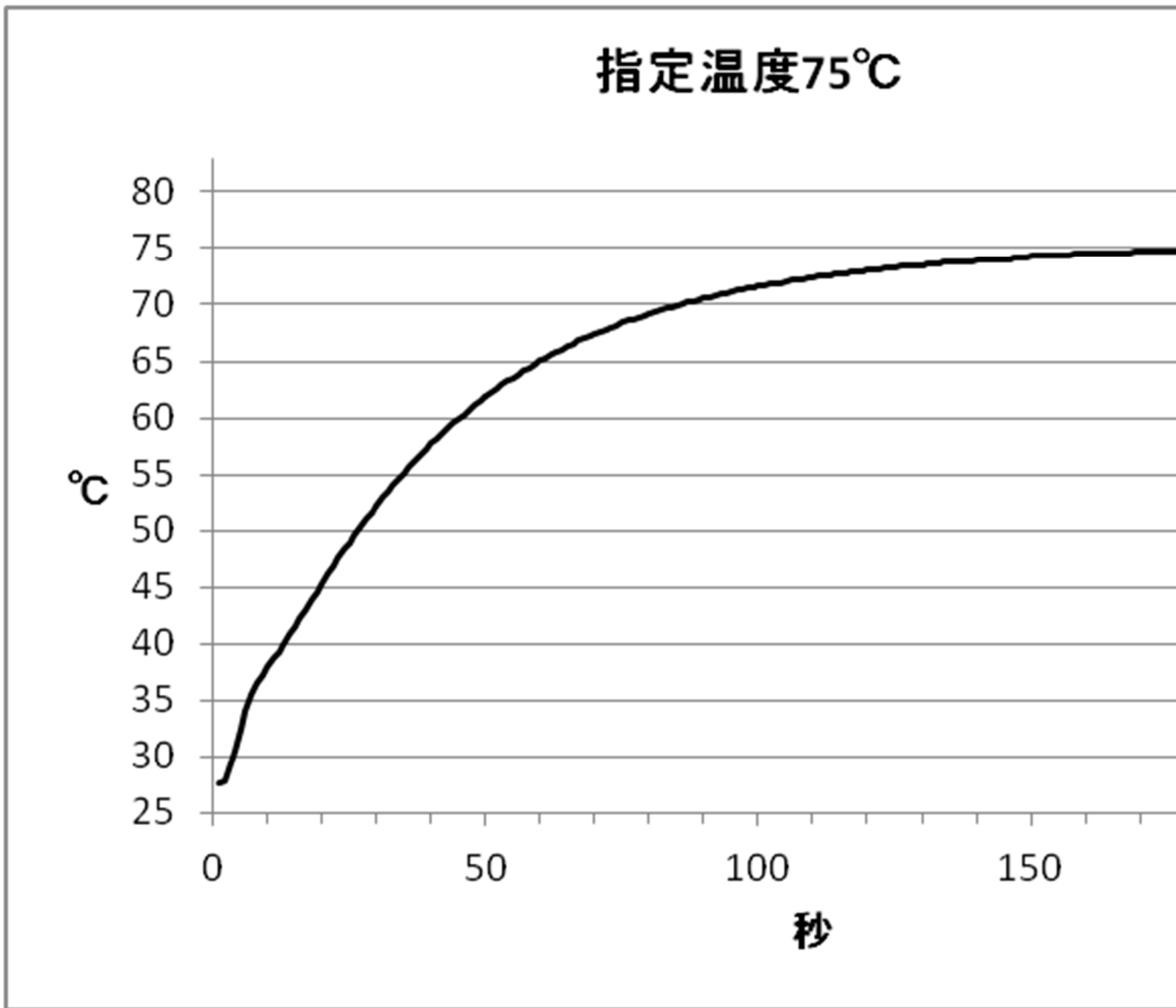


図3 指定温度75 とした場合の温度上昇曲線