

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

低温加熱調理を通じた猪肉におけるE型肝炎ウイルスの不活化に関する研究

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	米満研三	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	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	前田 健	国立感染症研究所獣医科学部
研究協力者	山田 研	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	秋元真一郎	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	迫井千晶	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	三浦拓真	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	野中 覚	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	山本彩乃	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校

研究要旨

猪生体は豚と同様、E型肝炎ウイルスに対する抗体保有率を示すことが本研究班の活動を通じて明らかにされてきた。厚生労働省では、猪肉の喫食に際し、十分な加熱調理を行う必要性について、消費者及び飲食店事業者等に向けた普及啓発を行っている。一方、猪肉をはじめとする野生鳥獣由来食肉は特性上、高温加熱調理により硬化しやすく、75℃を下回る温度帯での加熱調理が常態的に行われている。本研究では、猪肉をスチームコンベクションオーブンをを用いて低温加熱調理に供した場合のE型肝炎ウイルスの不活化を遺伝学的に評価することとした。加熱条件には、75℃1分のほか、60℃90分、63℃30分、65℃1分、65℃15分、68℃1分、68℃5分、68℃15分を採用した。E型肝炎ウイルスを検体中心部に添加後、回収した非加熱群では最大 $8.96 \times 10^6$ コピー数の同ウイルスが回収されたほか、60℃90分加熱群、63℃30分加熱群、65℃1分加熱群、65℃15分加熱群、68℃1分加熱群からは、RNase処理後であっても、それぞれ最大で $1.44 \times 10^3$ コピー、 $1.43 \times 10^3$ コピー、 $2.76 \times 10^3$ コピー、 $2.12 \times 10^3$ コピー、 $4.51 \times 10^5$ コピーの同ウイルスが回収された。一方、68℃5分加熱群、68℃15分加熱群、75℃1分加熱群については、RNase処理後には同ウイルスの回収は認められず、これらの加熱条件は概ね $10^4$ コピー数の低減効果を示す想定された。今後、同食肉の前処理等で汎用される塩蔵やマリネ等の処理による同ウイルスの不活化効果についても評価を行うことで、調理段階での同ウイルス制御に資する科学的知見の総合的集積にあたりたい。

A. 研究目的

近年の農林水産業をめぐる鳥獣被害の増加を受けて、野生鳥獣の食用としての利活用による鳥獣被害対策や地域活性化への取り組みが薦められている。農林水産省では、本年度に国産ジビエ認証制度を設け、ジビエの衛生的な利活用を推進している。食品としての安全確保に向けて、厚生労働省では平成

26年11月に「野生鳥獣肉の衛生管理に関する

ガイドライン」を策定し、とちく場に做った衛生的な取り扱いを周知したほか、本年度は日本ジビエ振興協会により、HACCP手引書が作成されたところである。一方、野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドラインでは、解体から調理に至るフードチェーン全体での衛生的取扱い方法について、詳細に例示されてはならず、各事業者が衛生的な取り扱いを行う上では、科学的根拠に基づく実態の把握並びに衛生確保に資する情報の提供が求

められている。

こうした背景を踏まえ、本分担研究では、野生鳥獣肉の調理段階における衛生管理の在り方を示す一例として、猪肉を対象とした場合の、低温加熱調理を通じた微生物汚染挙動のうち、特に E 型肝炎ウイルスの不活化効果に着目した上で、調理専門家を含めた体制で検討を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 食品検体及び加熱調理条件

#### (i) 無包装状態での検証

本研究では、猪モモ肉を供試対象とした。同検体は、解体加工後、冷凍保存・輸送されたものを、4 下で一晩自然解凍させた後、1 ブロックあたり約 80～100g となるよう、カットと真空包装を行ったものとした。加熱条件は以下のとおりである（図 1）。

猪肉ブロック検体を、検体中心温度がそれぞれ「60 90 分」、「63 30 分」、「65 1 分」、「65 15 分」、「68 1 分」、「68 5 分」、「68 15 分」、「75 1 分」となるよう、予熱したスチームコンベクションオーブン（ホシザキ MIC-5TB3、以下スチコン）内での加熱調理に供した。検体芯温が各設定温度に達した時点より、上記加熱条件を満たすまで加熱調理を行い、終了した時点で取り出し氷冷した。

### 2. 殺菌加熱量の算出

項 1. の加熱調理を行った際の検体中心部における温度推移については、HiTemp140-PT（Madge Tech 社）を用いて 1 分毎に測定記録した。測定記録値を下式にインプットし、部分的殺菌価[L]及び全体殺菌価 [L]を求めた。

$$[L] = (L_i + L_{i-1}) / 2 \times t_i$$

（ $L_i + L_{i-1}$ ：連続した L 値の合計（L 値は各時間での加熱殺菌価、 $t_i$  は測定時間間隔

（分）を示す）

### 3. E 型肝炎ウイルス添加回収試験

E 型肝炎ウイルス懸濁液を調整後、26G ニードル及びゴムシールを用いて各検体の中心部に接種した。同検体は、上項 1. に示した各条件に従って加熱調理後、滅菌ストマッカー袋（セントラル科学貿易）内で氷冷させた。滅菌袋で検体全量を細切した後、検体の 3 倍重量の緩衝ペプトン水（BPW、Oxoid）を加え、1 分間ストマッキング処理を行った。これらを試験原液として、下項 4. のリアルタイム PCR 試験に供した。なお、非接種群についても、同様の方法で試験原液を調整し、対照群として用いた。

### 4. リアルタイム PCR

各試験原液の RNase 処理及びウイルス RNA の精製は以下の方法によった。RNase 処理は、各試験原液に終濃度 20  $\mu$ g/ml となるように RNase A（ニッポンジーン）を添加し、37℃、1 時間処理した。その後、High Pure Viral RNA Kit（Roche）を用いてウイルス RNA を抽出し、これを鋳型として High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて cDNA を合成した。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix（TOYOBO）を用いてリアルタイム PCR を行った。条件は以下のとおりである。プライマーセット及び蛍光標識プローブとしては、JVHEV-F（5'-GGTGGTTTCTGG GGTGAC-3'）、JVHEV-R（5'-AGGGGT TGGTTGGATGAA-3'）、JVHEV-P（5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ-3'）を使用した。PCR 条件は初期変性を 95℃、60 秒、サイクリングは変性を 95℃、15 秒、伸長を 60℃、30 秒として 40 サイクルとした。

## 5. 衛生指標菌検出試験

上項 3. で調整した試験原液 100 $\mu$ L を標準寒天培地、Violet Red Bile Glucose (VRBG) 寒天培地、TBX 寒天培地各 2 枚 (1 検体あたり) に接種し、ISO 法で示される各条件に従い、培養及び判定を行った。

## C. 研究結果

### 1. 猪肉検体における衛生指標菌検出状況及び加熱殺菌量の評価

猪肉供試検体について、非加熱群における衛生指標菌検出状況の平均値は、一般細菌数が  $1.3 \times 10^6$  CFU/g、腸内細菌科菌群が  $2.9 \times 10^3$  CFU/g、大腸菌が  $4.6 \times 10^1$  CFU/g であった (表 1)。各条件の加熱処理群からは、腸内細菌科菌群及び大腸菌は検出されなかったほか、一般細菌数も最大で  $4.8 \times 10^0$  CFU/g であった (表 1)。

厚生労働省「食肉の加熱条件に関する Q&A」 (<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000365043.pdf>) では、「75 1 分」と同等な加熱殺菌の条件として、「70 3 分」、「69 4 分」、「68 5 分」、「67 8 分」、「66 11 分」、「65 15 分」が例示されている。

上記を指標としつつ、60、63、65、68、75 を設定温度とする低温加熱を通じた猪肉検体中心部の温度挙動をモニタリングし、加熱殺菌価を求めたところ、「63 30 分」と同等またはそれ以上と見做される加熱条件としては、「60 90 分」、「65 15 分」が挙げられたほか、「75 1 分」と同等またはそれ以上の加熱殺菌価を示す加熱条件としては、「68 15 分」が挙げられた (表 2)。

### 2. 低温加熱調理を通じた、猪肉検体における E 型肝炎ウイルスの消長

上項の成績を踏まえて、各加熱条件の低温加熱調理をスチコンを用いて行い、E 型肝炎ウイルスの消長を評価することとした。

評価にあたっては、回収した試験原液を RNase 処理した場合と処理しない場合それぞれを対象に含めた。接種ウイルス液中の遺伝子コピー数は RNase 未処理で  $4.35 \times 10^6$ 、RNase 処理を行った場合では  $1.29 \times 10^5$  となった (図 1)。

非加熱群における回収ウイルスコピー数は、RNase 未処理/RNase 処理それぞれで、 $6.79 \times 10^6$ / $2.99 \times 10^6$  コピーであった (図 1)。また、「75 1 分」加熱群では、RNase 処理の有無によらず何れも不検出となったが、RNase 未処理で評価した場合には、その他の加熱処理群は何れも数値の幅はあるものの E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出を認めた (図 1)。一方、より生存性評価を厳密に行うべく置いた RNase 処理を行った場合、「68 5 分」及び「68 15 分」加熱群は「75 1 分」加熱群と同様、不検出の結果を示した (図 1)。

## D. 考察

猪肉における E 型肝炎ウイルスの汚染可能性は数多くの同動物生体における侵淫状況から示唆されており、その結果を踏まえ、猪肉の喫食にあたっては十分な加熱調理が求められている。一方、同食肉の調理においては、低温度帯での加熱調理が汎用されている実態を鑑み、本研究では猪肉を低温加熱調理した場合の E 型肝炎ウイルスの消長を検討すべく、添加回収試験を行い、「68 5 分」または「68 15 分」の加熱条件が、E 型肝炎ウイルスの低減に資する可能性を示す知見を得た。

E 型肝炎ウイルスの耐熱性については、過去に少数ながら検討が行われているが、その多くは *in vitro* での評価にとどまっており、

本研究で実施した、猪肉を食品マトリックスとして設定した上で、低温加熱調理機を用いた評価はこれまで行われていない。

その意味において、本研究は新たな科学的根拠の一つとしての活用が期待され、68・5分以上の加熱条件（中心部）を満たすことが一つの目安となるものと思われる。但し、本年度の成績ではバラツキも複数認められたことから、その精査は引き続き行うべきと考えられる。

また、猪肉の調理にあたっては、塩蔵やマリネ等といった前処理を経た後に、加熱調理されることも多い。従って、猪肉の加熱調理を通じた E 型肝炎ウイルスの不活化に資する例示を総合的に行うためには、こうした前処理が E 型肝炎ウイルスの消長にもたらす効果についてもあわせて評価していくべきと考えられる。

## E . 結論

本年度は、低温加熱調理を通じた、猪肉中での E 型肝炎ウイルスの消長を検討した。加熱殺菌量を踏まえて設定した加熱条件のうち、「75 1分」のほか、「68 5分」または「68 15分」の加熱条件によっても E 型肝炎は検出されない状況となりうることが見出された。今後、調理工程で用いられる前処理方法等による同ウイルスの不活化効果についても評価を行い、調理段階での同ウイルスの低減の在り方を総合的に検討する上での基礎資料の創出につとめたい。

## 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

表 1 . 猪肉検体における衛生指標菌検出状況 .

群	一般細菌数 (CFU/g)		腸内細菌科菌群 (CFU/g)		大腸菌 (CFU/g)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
非加熱	1.30E+06	4.64E+05	2.94E+03	1.07E+03	4.64E+01	1.49E+01
60 90分	2.00E+00	8.94E-01	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-
63 30分	4.00E-01	4.00E-01	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-
65 1分	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-
65 15分	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-
68 1分	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-
68 5分	4.80E+00	1.47E+00	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-
68 15分	2.40E+00	1.47E+00	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-
75 1分	4.00E+00	8.94E-01	<2.0.E+00	-	<2.0.E+00	-

表2 . 猪肉検体中心温度推移データに基づく、加熱殺菌量の算定結果概要 .

中心加熱温度 ( )	加熱時間 (分) *1	殺菌加熱量*1	殺菌加熱量*2
60	90	46.45	49.94
63	30	32.11	49.47
65	15	28.16	54.61
	1	2.24	20.47
68	15	87.90	187.40
	5	25.12	130.02
	1	10.25	69.66
75	1	80.59	688.92

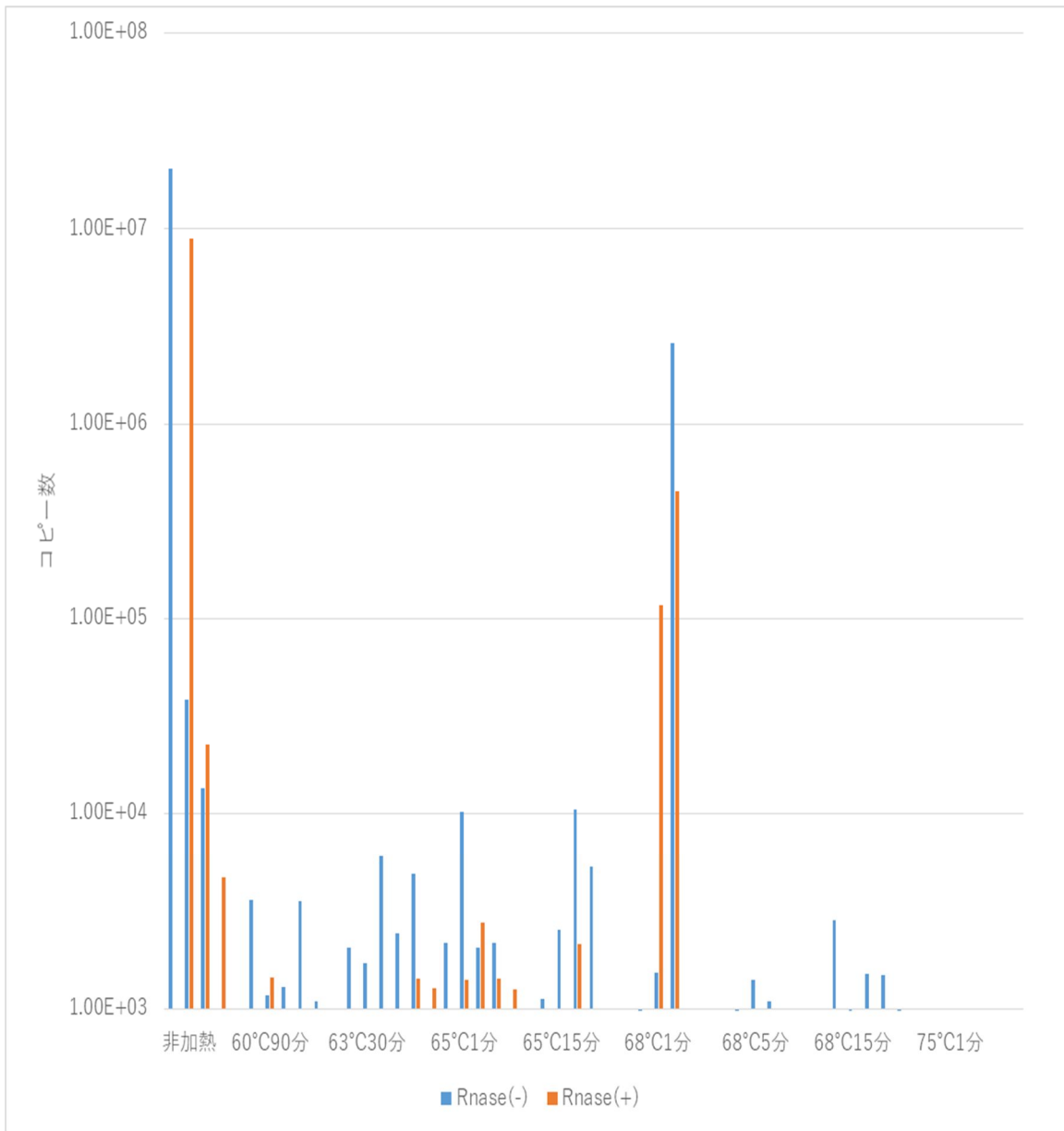


図1 . 低温加熱調理を通じた猪肉からの E 型肝炎ウイルスの検出結果概要 .