

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

畜産食品の安全性確保に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H25-食品-一般-011)

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

平成 27(2015)年 3 月

目次

I. 平成 26 年度総括研究報告書

- 畜産食品の安全性確保に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
研究代表者 岡田 由美子

II. 分担・協力報告書

1. 海外における生食用食肉製造時の衛生管理実態に関する研究・・・・・・・・・・ 17
岡田 由美子、五十君 静信
2. 畜産食品が原因の寄生虫性食中毒に関する研究：遺伝子検査法の検証とエゾシカ肉
中の住肉胞子虫汚染調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21
鎌田 洋一、白藤 由紀子、佐藤 弘隆
3. 牛消化管内の大腸菌群等の分布状況・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
山崎 伸二、日根野谷 淳
4. 放射線照射による微生物除去・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47
等々力 節子、川崎 晋、都築 和香子
5. 高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する検討・・・・・・・・ 63
萩原 博和、阿部 申、岡田 由美子、五十君 静信

III. 委託報告書

- 海外の食肉や内臓肉の生食実態に関する基礎的情報の収集支援業務（その 2）報告
書・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 75
三菱総合研究所

平成 25 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の安全性確保に関する研究 (H25-食品-一般-011)

総括研究報告書

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

研究要旨

現在わが国の畜産食品は、これまで生食されなかったものが生食されるなど、食文化が多様化してきている。しかしながら、畜産物の生食は腸管内の微生物や寄生虫等による食中毒の危険性が高く、近年、食中毒事例が頻発していることから、畜産物の生食による食中毒を未然に防止するための畜産物中の食中毒菌の検査手法や除去方法を提供する必要がある。本研究では、腸管出血性大腸菌などの細菌と生食でしばしば問題となる寄生虫を主な危害の対象として、動物の食肉や内臓肉を生で食することのリスクについて、牛、馬、豚等について検討した。

まず、食肉の生食実態及び製造上の衛生管理について情報収集を行い、食肉を生食することのリスクについて危害分析を行った。牛の消化器については、大腸菌群等の汚染実態及びその季節変動について明らかにした。また、我が国における馬肉中の住肉胞子虫試験方法の検討及びシカ肉中の住肉胞子虫汚染実態を明らかにした。

次に本研究班では、畜産食品中の病原微生物を生食の可能なレベルまで低減する方法について検討した。海外で食肉に用いられている放射線殺菌法が牛肝臓に対しても有効であるかの検証を昨年度に引き続き行い、有効性が認められる条件を明らかにすると共に、処理によって発生する副生成物について解析した。また、高圧処理による殺菌方法についても検討し、昨年度に見られた肝臓の硬化及び変色を起こしにくい条件での微生物削減について検討した。

分担研究者：
等々力 節子 独) 農研機構 食品総合研究所
山崎 伸二 大阪府立大学大学院
鎌田 洋一 岩手大学
荻原 博和 日本大学
五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

川崎 晋 独) 農研機構 食品総合研究所
都築和香子 独) 農研機構 食品総合研究所
日根野谷淳 大阪府立大学大学院
白藤由紀子 岩手大学
佐藤 弘隆 岩手大学
阿部 申 日本大学

研究協力者：

A. 研究目的

日本国内で平成 23 年に発生した、牛肉の生食による腸管出血性大腸菌集団食中毒事例をきっかけに、食肉及び内臓肉を生食することの危険性が広く再認識された。食の安全を確保するため、生食用牛肉の加工基準の設定及び牛肝臓の生食禁止という行政措置が実施されたがその一方で、豚肝臓の生食の増加、ジビエと呼ばれる野生鳥獣肉の喫食が増加しつつあり、これまでとは異なる健康被害の可能性が高まっている。また、牛肝臓の生食の安全性を確保することにより、規制の解除を求める声もみられている。本研究では、食肉及び内臓肉を生で食することによるリスクを明らかにすることを目的として、海外における生食用食肉の製造時の衛生管理実態の調査や、国内での牛の消化器部位における大腸菌群等の汚染実態調査と季節変動、食肉中の寄生虫汚染実態に関する調査等を行った。更に、畜産食品を汚染する食中毒菌を低減することを目的として、放射線照射及び高圧殺菌の効果と問題点について科学的に検討した。

B. 研究方法

(1) 海外における食肉の生食用食肉製品の衛生管理の実態調査

株式会社三菱総合研究所への委託事業として、文献調査、インターネットを通じた調査及び在日大使館への聞き取り調査を通じて、ドイツにおける豚肉の生食製品であるメットの製造工程における衛生管理実態及び健康被害について情報を収集し、その結果について検討した。

(2) 馬肉中の住肉胞子虫の遺伝子検査法の検証とエゾシカ肉中の住肉胞子虫汚染調査

馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法には、株式会社 千興ファーム（熊本県）から購入した 7 頭分の馬横隔膜を用いた。現行検査法に基づき、DNeasy Blood & Tissue Kits を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて、定性 PCR を行った。プライマーは厚生労働省通達の現行検査法で使用されているものを用いた。得た PCR 産物について、当研究室保有の *Sarcosystis fayeri* 遺伝子陽性コントロールとともに、アガロースゲル電気泳動を行い、約 1100 bp の遺伝子増幅産物が確認されたものを陽性と判定した。

定量 PCR は、各検体から 0.3 g の馬肉を 2 か所採取し、DNA を抽出した。また、同じそれぞれの検体から、馬肉を 10 g を 2 か所採取し、ぶつ切りにしたものに PBS 30 mL を加え、ホモジナイザーで均質化した。均質化後、粥状になった馬肉サンプルを 200 μ L 採取し、DNeasy Blood & Tissue Kits を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて定量 PCR を行った。使用したプライマーは、八木田 健司 博士（国立感染症研究所）が設計した *Sarcocystis* 属共通遺伝子配列を利用したプライマーを参考に作成し、NIPPON GENE から供与された *S. fayeri* 遺伝子陽性コントロールを用いて、絶対定量を行った。遺伝子陽性と判定された検体から、馬肉 0.3 g を 8 か所、馬肉 10 g を 8 か所採取した。前述の方法と同様に DNA を抽出し、遺伝子定量用のプライマー で定量 PCR を行った。また、この結果を用いて、馬肉 10 g 均

質化検体に1~8の番号をつけ、乱数発生ソフトウェア (<http://tools.huu.cc/rand/>) によって乱数を発生させ、馬肉を20 g、30 g、40 g 用いて実験をした場合の相対標準偏差 (以下、rSD) を推察した。馬肉20 g を用いた場合の実験結果を推察する場合、2つの乱数を8回発生させ、出た乱数の番号の検体遺伝子コピー数に基づき標準偏差 (以下、SD) および rSD を算出した。

エゾシカ肉の住肉孢子虫遺伝子検査は、北海道のシカ肉販売業者より分与を受けたエゾシカ肉50検体 (横隔膜部分) を用いた。シカ肉中の住肉孢子虫遺伝子検査法は、厚生労働省が通知した住肉孢子虫定性遺伝子検査法を適応した。PCR産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子陽性か否か判断した。

(3) 牛消化管内の大腸菌群等の分布

牛消化管組織内の大腸菌群細菌数の測定とPCR法による *stx* 遺伝子の検出は、牛の屠畜解体直後に唾液 (n=41)、第一胃 (n=46)、十二指腸 (n=68)、盲腸 (n=69)、直腸 (n=65) のそれぞれの内容物と胆嚢 (n=65)、肝臓 (n=69) と胆汁 (n=69) を採取し直ちに研究室に持ち込み実験に供した。肝臓に滅菌PBSに加え、ストマッカー処理を30秒間以上行ない、得られた懸濁液と原液の胆汁を直接滅菌PBSで希釈し、マッコンキー寒天培地に植菌して、37°Cで一夜培養し大腸菌群細菌数を測定した。さらに、ストマッカー処理した肝臓検体と胆汁検体に1.25倍のTSBを加え37°C、18時間、浸透培養し、得られた増菌培養液にTE bufferを加えて加熱し、

その上清を鋳型DNAとして *stx* 遺伝子の検出するためのPCRを行なった。

肝臓内の大腸菌群細菌の分布と *stx* 遺伝子のPCRによる検出は、牛肝臓を可食部に相当する部位1と2、非可食部の3、4、5とに分け、胆汁と共に大腸菌群細菌数の測定とPCR法による *stx* 遺伝子の検出を試みた。

(4) 放射線照射による微生物除去

微生物試験用の牛肝臓試料は、つくば市内の精肉店より凍結状態の牛肝臓塊、もしくは東京芝浦食肉処理場にて屠殺直後に凍結した牛肝臓塊を用い、購入後-80°Cで保存した。牛挽肉はつくば市内の精肉店より購入した。試料は25gの塊となるよう無菌的に切り分け、各々ガスバリア性の袋に移した後、-80°Cで冷凍保存した。品質評価用の牛肝臓試料は、東京芝浦食肉処理場より、屠殺した翌日または翌々日に、冷蔵状態で入手した。肝臓は入手日のうちに50g程度の塊に切り分けて、ガスバリア袋 (PTS袋、三菱ガス化学製、PB180250P 180×250mm) にいれ、含気状態または脱気状態で包装した。包装後の試料は、冷蔵(0°C)照射では照射水中に3時間、凍結(-80°C)照射では超低温槽に一晩保管し、照射前の温度を恒温とした。

供試菌は、研究機関および研究協力機関が所有する *C. jejuni* 5096株を用いた。

供試菌は Brucella Broth(Difco)を用いて、微好気条件下で41.5°C一昼夜静置培養した後、遠心分離(4000 g, 5 min)により菌体を収集、培地成分を除去した。

菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 10^9 CFU/mL となるように調整、使用した。

ガンマ線照射はコバルト 60 線源を装填した Gamma Cell 220 を用いた。照射時の温度は、氷冷 (0°C) および冷凍 (ドライアイス下) (-80°C) の 2 条件を設定した。照射中の温度を一定に保つため、照射チャンバーと同形状の筒状型発泡スチロール箱を作成し、この中央に予冷した検体を入れ、周囲に氷 (0°C) もしくはドライアイス (-80°C) を封入した。

吸収線量は試料に装着したアラニンペレットの信号を ESR 装置で測定して決定した。検量線は英国の National Physical Laboratory の標準アラニンペレットで作成した。

菌体の接種は、自然解凍後した牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液を注射針により注入することで行った。菌体濃度は終濃度で、 10^8 CFU/g 程度となるように調製した。菌体接種後の試料は、直ちに、ガスバリア袋 (PTS 袋) を用いて含気あるいは真空包装を行った。含気条件では、ヘッドスペースに空気を残し、脱気条件では、真空包装機を用いて、袋内の空気を抜いてヒートシールした。包装後の検体は、氷中もしくは -80°C の冷凍庫内で 2 時間以上放置して温度を一定にした後、冷蔵では $0\sim 1.2$ kGy、冷凍では $0\sim 3.0$ kGy の範囲の線量を照射した。照射後の検体は直ちに、もしくは解凍後直ちに菌数計測した。

ガンマ線照射後の検体は、滅菌緩衝ペプトン水 (BPW) を加えて 10 倍乳剤とし、必要に応じてその 10 倍段階希釈試料液を調製した。各 10 倍段階希釈試料液は、標

準寒天平板および mCCDA 平板にスパイラルプレーティング法で塗抹した。標準寒天平板は好気条件で 35°C 、mCCDA 平板は 41.5°C で各々 48 時間培養し、その出現集落数から 1 g 当たりの一般生菌数ならびに *C. jejuni* の数を求めた。mCCDA 平板上の集落については、平板あたり 5 つの集落を選択し、これらをイムノクロマト法による *Campylobacter* 同定キットに供し、典型集落が *Campylobacter* 属であることを確認した。

TBA (チオバルビツール酸) 価の測定は、(一財) 日本食品分析センターに委託して実施した。

照射および非照射の牛肝臓にメタノールを加えてホモジナイザー (AM-8 型, Nissei) で 2 分間攪拌後、抽出液をろ過した。さらに残渣をクロロホルム/メタノール (2:1) (C/M) 溶液で 2 回抽出後 C/M 溶液で洗浄した。集めた抽出液に 0.88% KCl 溶液を加えて分液ロト中で混和し、1 晩放置後、クロロホルム層を集め、硫酸ナトリウムで脱水した後に濃縮し、Hexane/ 2-prpopanol (3:2) 溶液で定容した。脂質溶液から 25mg 分の脂質を秤取り、2mg のトリデカン酸を内部標準として添加し、3 フッ化ホウ素メタノール試薬により脂肪酸をメチルエステル化し、GC で分析した。

2-アルキルシクロブタノン分析は、牛肝臓に硫酸ナトリウムを加え乳鉢中で均一に混和し、氷上で 30 分放置した。これをステンレス製遠心チューブに移し、ヘキサンを加え、高速ホモジナイザー (ヒスコトロン NS-52 型, マイクロテック社製) で 1 分間攪拌後、 $10,000 \times g$ で 10 分

間違心し、ヘキサン画分を集めた。この抽出操作を繰り返し、集めたヘキサン溶液に硫酸ナトリウムを加えて脱水した。ヘキサン抽出液の溶媒を留去後、抽出物をアセトンに再溶解し、さらにアセトニトリルを加えて-20℃で30分以上冷却して脂肪分を析出させた。これを0℃、1,680 x gで10分間遠心して取り除き、2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)が含まれる上清を濃縮して、ヘキサンに再溶解した。この溶液をガラス製のシリカゲルカラム(Merck Shilica gel 60 70-230 mesh)2本に添加し、ヘキサンで洗浄後、ヘキサン/ジエチルエーテル(98:2)で溶出し、その5-15mL画分を集めた。この試料を濃縮してGC-MSで分析し、2-ドデシルシクロブタノン(2-dDCB)および2-テトラデシルシクロブタノン(2-tDCB)、2-テトラデセニルシクロブタノン(2-tDeCB)を定量した。

フランの分析は、牛肝臓の左葉部分を約100gの塊に切り分け、ガスバリア袋にいれ、含気状態のままヒートシールし、予冷の後、3 kGy (0℃)、または10kGy (-80℃)を照射した。照射後の試料は分析に供するまで、-80℃で凍結保管した。分析は、(一財)日本食品分析センターに委託して実施した。ポリエチレンバックに含気状態で包装した牛肝臓を、氷冷状態(0℃)で6kGy、ドライアイス下(-80℃)で10kGyの2条件でガンマ線照射し、照射後の試料は-80℃で保管した。分析時には、未開封の状態の試料を冷蔵庫中に移して解凍し、冷蔵庫から取り出した後、速やかに塩化ナトリウムを入れたヘッドスペースバイアルに採取した。このバイ

アルに、あらかじめ氷冷した精製水を加えた後直ちに密栓し、d4-フラン50 ng(内標準物質)を添加し試験溶液とした。バイアル中のヘッドスペースガスを、ヘッドスペースサンプラーによりガスクロマトグラフ-質量分析計に注入し、得られたピーク高比から、予め作成した検量線を用いて試料中のフラン濃度を求めた。

(5) 高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する検討
250MPa の高圧処理及び圧力時間が *Escherichia coli* と *Salmonella* Typhimurium に及ぼす死滅効果に *E. coli* ATCC 25922 と *S. Typhimurium* IID 1000 を用いた。培養液は、洗浄後リン酸緩衝液中の菌数が 10^8 CFU/mL となるように調整してアンプルに充填し、高圧処理の試料とした。高圧処理装置は、高圧ポンプ、ヨークフレーム、圧力装置、制御盤から構成される加圧装置と恒温循環装置からなるスギノマシン社製を(HPV-80C20-S)を用いた。加圧条件は250MPaで60分、120分、180分とした。高圧処理後、ペプトン加生理食塩水を用いて段階希釈を行ってPCA培地を用いて混釈培養し、集落数を計測した。

高圧処理における食品媒介病原細菌の死滅効果の検討には、*E. coli*、*S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Cronobacter sakazakii*、*Providencia alcalifaciens*、*Yersinia enterocolitica*の計7菌株を用いた。各菌株の培養液は、洗浄後リン酸緩衝液中の菌数が 10^8 CFU/mL となるように調整して高圧処理の試料とした。加

圧条件は 250MPa で 180 分とした。高圧処理後、アンプルから試料液を取り出し、ペプトン加生理食塩水を用いて段階希釈を行った。これらの希釈液は非選択培地である PCA 培地を用いて混釈し、37℃及び各菌の至適温度で 24 時間培養し、発育した集落を計測した。

牛肝臓に接種した *E. coli* の高圧処理による死滅効果の検討は、*E. coli* 10⁸ CFU/mL の菌液を使用し、牛の肝臓を横 2cm×縦 3cm、厚さ 0.5cm 程度・重量 10g の長方形にカットしたブロックに、*E. coli* の菌液を等間隔 10 カ所に合計 100 μ l を接種した。接種した肝臓は二重の密封状態にして高圧処理用の試料を作製した。加圧条件は 250MPa で 60 分、120 分、180 分とした。高圧処理後、プラスチックバックから内臓のブロックを取り出し、ストマッカーバックに内臓 10g と希釈水 90mL を分注して、2 分間のストマッキング処理を行い調製した。これらの調製液は希釈水を用いて段階希釈を行い、非選択培地である生菌数用の PCA 培地を用いて混釈し、37℃で 24 時間培養した。培養後発育した集落を計測した。さらに *E. coli* 数は選択培地である酵素基質培地；X-MG 培地を用いて混釈し、37℃で 24 時間培養し、発育した青色の集落を計測し、*E. coli* 数とした。

高圧処理における肝臓の肉色と硬さの検討は、前項と同様の肝臓をプラスチックバックに密封し、250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行った。高圧処理後の肉色の変化を色差計で測定した。肉質の硬さはレオメーターを用いて測定すると共に、目視で肝臓の肉色さらに肝臓を触感で硬

さを確認した。色差計はミノルタ社製の色彩色差計を使用した。

肝臓の色の変化を L 値、a 値、b 値で測定を行った。硬度計はサン科学社製のレオメーター、CR-3000EX を用いて行い、肝臓の肉質の変化を硬度 (kgf/mm²) で測定した。

C. 研究結果

(1) 海外における食肉の生食用食肉製品の衛生管理の実態調査

EU 加盟国であるドイツは、EU 食品安全法に適合する形で食品安全対策を実施しており、連邦レベルで定めた法令を各州の責任において公的な監視や食品のモニタリングプログラムとして実施していた。動物由来食品に関する連邦レベルの法令である動物由来食品衛生規則において、ひき肉の製造及び取扱いに関する要件が定められており、製造加工施設、原材料肉、製造前後の衛生管理が定められていた。また、法令遵守に対する公的な監視や食品モニタリングプログラムは各州の責任において実施されているが実際に監視を行うのは州の下にある地方自治体である郡あるいは郡独立市の獣医局等であった。食品企業や飲食店等の監視項目としては、設備、作業方法、衛生要件の遵守、トレーサビリティ、企業の自己検査、表示・宣伝等があった。企業や事業所に対する監視活動については、連邦レベルで統一的な枠組みが規定されており、企業や事業所への立入検査の頻度を決定する算定方法が示されており、州はこの算定方法の結果に基づき、企業や事業所への立入検査を実施していた。メットの喫

食による健康被害の実態は、2007 年から 2012 年にかけて、14 件見られた。その原因物質は、メットの生食によるものではサルモネラ、カンピロバクター、寄生虫（サルコシスティス）、ノロウイルスであった。メットによる食中毒 14 件中 5 件では、原料に生卵を用いており、原因菌が生卵から検出された例も 1 例見られた。

（２）馬肉中の住肉胞子虫の遺伝子検査法の検証とエゾシカ肉中の住肉胞子虫汚染調査

馬肉の住肉胞子虫遺伝子検査法改良の検討：定性 PCR 遺伝子増幅の結果から馬肉のうち、1 検体は採取した 2 か所とも遺伝子増幅は確認されなかった。2 検体は 2 か所採取したうち、片方のみ遺伝子増幅が確認された。また、4 検体では採取した両方で遺伝子増幅が確認された。これらの結果から、2 か所とも陰性の検体は住肉胞子虫遺伝子陰性、残りの検体は住肉胞子虫遺伝子陽性と判断した。住肉胞子虫遺伝子陰性検体と陽性の 2 検体を用いて定量 PCR を行った。馬肉 0.3 g を用いる方法と 10 g を均質化して検査に供する方法の比較を行った。遺伝子陰性と判定された検体で、馬肉 0.3 g を用いる方法では遺伝子増幅が検出されなかったが、馬肉 10 g を用いる方法では遺伝子増幅が検出された。また、陽性 2 検体では、馬肉 10 g を均質化する方法で、0.3 g を用いる方法より低い rSD が得られた。

陽性検体の一方から馬肉 10 g を 8 か所採取し、均質化後、DNA を抽出した。他方の陽性検体からは馬肉 0.3 g を 8 か所採取し、現行検査法と同様に DNA を抽出し

た。それぞれの抽出 DNA を用いて定量 PCR を実施した。馬肉 10 g を均質化する方法では、馬肉 0.3 g を用いる方法よりも、低い rSD を示した。乱数発生ソフトウェアを用いた解析の結果では、想定サンプル馬肉量を増量することで、標準偏差および相対標準偏差がともに低下した。

エゾシカ肉における住肉胞子虫汚染状況：厚生労働省が通知した住肉胞子虫遺伝子定性検査法が妥当かどうか、シカ肉よりシストを取り出し、DNA 抽出を行った。住肉胞子虫遺伝子定性 PCR を、抽出 DNA に適応したところ、明瞭に遺伝子増幅が確認された。以上の結果は、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子定性検査法が、シエゾシカ肉中の同寄生虫遺伝子検査に適応できることを示している。

エゾシカ肉より DNA を抽出し、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子共通配列について、PCR を行った。50 検体のうちの 48 検体から、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子の増幅が確認された。

エゾシカの推定年齢と遺伝子陽性率との関係は、遺伝子陽性率が非常に高いため、推定年齢との関係は不明だった。

（３）牛消化管内の大腸菌群等の分布

牛消化管組織内容物の大腸菌群細菌数を測定したところ、唾液から肛門にかけてほぼ 100%で大腸菌群細菌が検出された。検出された細菌数も第一胃から肛門に近づくに従って高くなった。しかしながら、胆汁では 14%、肝臓では 68%で陽性となった。

牛消化管組織内容物の *stx* 遺伝子の PCR 法による検出では *stx* 遺伝子は肛門組織

で 78.3%と最も陽性率が高かった。しかしながら、肛門内容物では 45%、盲腸組織では 29%、盲腸内容物で 26%、十二指腸組織で 5.8%、十二指腸内容物で 15%、第一胃内容物で 8.6%であった。

一方、唾液で 22%とやや高めの値を示した。胆汁では調べた 149 検体全てで検出されなかったが、肝臓では 3.3%で陽性となった。また、肝臓から 68%の割合で大腸菌群細菌が検出されたため、肝臓を 5 つの部位に分けてどの部位で大腸菌群細菌が多く分付するかについて調べたところ可食部に相当する部位では、陽性率が 26 と 34%と低かったのに対し非可食部位ではそれぞれ 52、57、53%と高かった。さらに、季節性を考慮して比較すると、比較的気温の高い High シーズンでは、非可食部位の陽性率は 70%まで上がるのに対し、可食部位の陽性率は 20%以下と低くなった。

前項で 肝臓から 3.3%の割合で *stx* 遺伝子が検出されたため、肝臓を 5 つの部位に分けてどの部位で *stx* 遺伝子が検出されるかについて調べた。その結果、可食部位では全く検出されず、*stx* 遺伝子が検出されたのは、非可食部位であった。現在得られた PCR 産物が *stx2* に特異的なものであるか確認中である。

(4) 放射線照射による微生物除去

牛肝臓および牛挽肉中において *C. jejuni* を接種し、ガンマ線照射を行った。*C. jejuni* の D_{10} 値は大腸菌株よりも低い結果を得た。牛肝臓においてはガンマ線抵抗性の試験指標菌として詳細に検討する必要はないと現時点では考えられた。

加えて-80℃で凍結した検体では、凍結および解凍の時点で本菌の菌数が 1 ケタ低下し、これは牛肝臓・挽肉共に観察された。すなわち、*Campylobacter* 属については凍結融解ストレスによる死滅も加えて考慮でき、適切に凍結融解がなされるのであれば、 D_{10} 値の効果に加えての死滅効果が期待されると考えられた。

一般的に脂質の過酸化と相関があるとされる TBA 価は、0℃、含気状態の照射で線量に応じて増加したが、0℃、脱気包装の照射では、統計的に有意な増加は見られなかった。また、-80℃凍結状態の照射でも、TBA 価は非照射のコントロールに比べてやや増加する傾向はみられ、含気包装では 10 kGy の照射で、統計的に有意な増加がみられたがその変化量は非常に小さく、また、脱気包装では、10kGy の照射でも有意な増加は検出されなかった。

今回の試験で用いた牛肝臓は、主な構成脂肪酸として、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1-9c)、パルミチン酸(16:0)、リノール酸(18:2-9c,12c)、アラキドン酸(20:4)などが含まれていた。また、含有量は少ないが、不飽和脂肪酸では、バクセン酸(18:1-11t)のほか 18:1,18:2 などの C18 のトランス異性体の他、C14~C17 のトランス型のモノエン酸も非照射及び照射のいずれの検体にも含まれていた。

ガンマ線照射によって、いずれの照射条件の試料でもトランス異性体がわずかに増加した。特に 0℃の照射では線量に応じた増加が顕著で、6kGy の照射では 18:1 および 18:2 のトランス酸の総量や炭素数 18 のトランス酸の総量、より短鎖のトラ

ンス酸も加えた総トランス脂肪酸量について、非照射試料と比較して統計的な有意差が認められた。凍結下の照射でも10kGyでは統計的に有意なトランス酸の増加が認められた。含気包装と脱気包装の同一温度、同一線量でのトランス異性体の量は統計的には有意な差は認められず、TBA 価の場合と異なり、包装条件による影響はほとんど認められなかった。

今回の照射条件の範囲内では、飽和脂肪酸の割合の増加や、多価不飽和脂肪酸の減少は認められなかった。

2-アルキルシクロブタノン類 (2-ACBs) は照射より特異的に生成する脂質の放射線分解物であるとして、照射食品の検知の指標物質として利用されている。分析方法の精度確認として、分析に用いた肝臓と同ロットの試料に標準試薬をスパイクして添加回収率を求めた。この試験は、実試料の分析期間の最初と最後及び中間の期間の3日に分けて3併行で実施した。低濃度添加として、2-dDCB および 2-tDCB を 2 ng/g FW、2-テトラデセニルシクロブタノン (2-tDeCB) を 5 ng/g FW で、スパイクして行った際の回収率は、 64.7 ± 10.3 , 68.3 ± 9.8 および $62.7 \pm 9.8\%$ (n=9) であった。また、高濃度添加として 2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB を 20 ng/g FW, 20 ng/g FW, 51 ng/g FW で添加した際の回収率は 59.6 ± 4.1 , 59.9 ± 4.3 および $61.8 \pm 5.1\%$ (n=9) であった。

3 種の異なる温度包装条件で照射した際の 2-ACBs の定量結果では、非照射のコントロール試料からはいずれの 2-ACBs も検出されなかった。また、同一の温度と包装条件下の照射では、線量にほぼ比例

して、3 種の 2-ACBs が検出された。そこで、同一条件での分析値を線量に対して直線回帰した傾きから、1 kGy あたりに換算した 2-ACBs の生成量を求めて表 5 にまとめた。この際の相関係数は、0.87~0.97 であった。

肝臓生重量・1 kGy あたりの 2-dDCB および 2-tDCB の生成量は、2-tDCB の含量が 2-dDCB の含量に比べて大きく、-80°C に比べて 0°C の照射の方がやや大きな値となった。一方、オレイン酸を前駆体とする 2-tDeCB は、-80°C 照射における生成量が 0°C 照射の場合に比べて著しく大きくなった。なお、包装条件により同一温度内での 2-ACBs 生成量には若干の差がみられるものの、分析値の変動を考慮すると有意な差としては検出されないと考えられた。

今回採用した分析条件において、繰り返し測定 of 標準偏差に基づいて求めた、フランの定量下限値 (LOQ) および検出限界値 (LOD) はそれぞれ 2 ng/g FW および 0.5ng/ g FW であった。牛肝臓を分析した結果、照射(6kGy 0°C、10 kGy-80°C)および未照射試料のいずれにおいても、定量下限を超える濃度のフランは検出されなかった。

(5) 高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する検討

高圧処理前の *E.coli* 菌数は 9 log CFU/mL であった。これらの菌液を 150MPa の高圧処理を行ったところ、60 分、120 分、180 分と処理時間が長くなるにつれて菌数が減少する傾向が見られるものの、有効な死滅効果は認められなかった。

200MPa では 60 分処理で 7 log CFU/mL, 120 分処理で 6 log CFU/mL, 180 分処理で 5 log CFU/mL と直線的に菌数が減少する傾向が認められた。250MPa では 60 分処理では、9 log CFU/mL から 6 log CFU/mL と約 3 D の死滅効果が得られ、120 分処理では 5 log CFU/mL、180 分処理では 3 log CFU/mL となり、約 5 D の有効な殺菌効果が認められた。*S. Typhimurium* では、未処理の菌数が 9 log CFU/mL のものが、150MPa では 180 分処理で 7 log CFU/mL に減少した。200MPa では 60 分処理で 8 log CFU/mL に、180 分処理では 6 log CFU/mL に減少し、3 D の死滅が認められた。250MPa では 150 や 200MPa に比べて菌数の減少効果は高く、60 分処理では 6 log CFU/mL に、120 分処理では 4 log CFU/mL、180 分処理では 3 log CFU/mL にまで減少した。*E. coli* と *S. Typhimurium* はいずれも約 5 D の有効な殺菌効果が認められ、低圧の 250MPa でも高圧処理の時間を数十分の単位から時間の単位に延長することにより、高圧の 400MPa と同等の殺菌効果が得られることが確認された。さらに、処理時間の延長は緩やかな殺菌効果であるものの、有効な殺菌効果を得ることが可能であると推察された。

食品媒介病原細菌の死滅効果の検討では、未処理での菌数は約 8~9 log CFU/mL であった。250MPa で 180 分処理を行った結果、生残菌数は *S. Typhimurium*、*P. aeruginosa* と *E. coli* では 3 log CFU/mL となり、5 D の殺菌効果が認められた。さらに *C. sakazakii* では 2 log CFU/mL、*Y. enterocolitica*、*P. alcalifaciens*、*S. Enteritidis* の 3 菌種では 2 log CFU/mL

以下の数値で検出され、高圧に対する感受性が高い結果であった。

以上の結果、食品媒介病原細菌 6 菌種について 250MPa で 60 分処理を検討したところ、5 D の有効な殺菌効果が認められ、*E. coli* のみではなく他のグラム陰性の病原菌にも有効であることが明らかとなった。

牛肝臓に接種した *E. coli* の高圧による死滅効果の検討では、高圧未処理の肝臓からは生菌数及び *E. coli* 数は 7 log CFU/g を示した。これらを 250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行ったところ、60 分処理では生菌数及び *E. coli* 数は 1D の減少、さらに 120 分処理では 2 D の減少が認められた。さらに 180 分では生菌数で 3 D、*E. coli* で 2 D の死滅が認められた。

肝臓の色調と硬さに及ぼす高圧処理と処理時間の影響では、未処理の肝臓の肉色は L 値が 34.14 ± 0.93 、a 値が 9.50 ± 0.23 、b 値が 4.43 ± 0.50 であった。250MPa の圧力処理を行うと 60 分処理で L 値が 41.74 ± 0.48 、a 値が 16.17 ± 0.51 、b 値が 7.04 ± 0.79 となり、高圧処理では L 値である明度が明るくなる傾向が認められ、さらに a 値の赤みはより赤くなる傾向が観察された。120 分処理では L 値が 43.33 ± 1.17 、a 値が 15.71 ± 0.93 、b 値が 7.18 ± 1.26 となった。さらに 180 分処理では L 値が 45.68 ± 0.95 、a 値が 14.29 ± 0.38 、b 値が 7.21 ± 0.62 となり、圧力処理時間の延長とともに肝臓の色彩は、明るい色を示し、高圧処理を行うと赤みが増加するが、処理時間が長くなるにつれて僅かであるが減少する傾向が認

められた。高圧処理における肝臓の硬さの変化は、レオメーターを用いて検討を行った。肝臓の硬さは、硬度の数値で示した。未処理の状態では 0.0152 ± 0.0068 kgf/mm² を示し、250MPa では 60 分処理を行うと 0.0246 ± 0.0046 kgf/mm²、120 分処理では 0.0249 ± 0.0048 kgf/mm²、180 分処理では 0.0343 ± 0.0088 kgf/mm² の数値が得られた。肉の硬度は 250MPa の圧力では時間の経過とともに数値は高区なる傾向を示した。しかし、触感では明らかに硬いと思われる感触ではなかった。高圧処理による肝臓の目視及び触感では、未処理と高圧処理との間には明らかな相違が観察されたものの、高圧後は肝臓の肉色は未処理のものより赤みがかかった色彩を示した。しかし、処理時間に関しては感覚的に色合いや硬さについては処理を行うことによって顕著な差は感じられなかった。

D. 考察

昨年度の研究で、ドイツのメットについては、容器包装されスーパー等で市販されていることが明らかとなったため、日本国内での畜産食品の衛生管理等に参考とする目的で、今年度はメットの衛生管理及び規格基準についての情報を収集した。ドイツにおいてメット独自の公的な微生物成分規格はなく、ひき肉製品の製造加工要件が定められており、その遵守については連邦ではなく州レベルでの監視・モニタリングが行われていることが明らかとなった。また、製造販売業者は衛生管理に関して外部認証を取得しており、出荷前の自主検査と共に外部監査

機関での検査も実施していることが明らかとなった。一方で、近年においてもドイツでメットの喫食によるサルモネラ症及び旋毛虫症等の発生が見られていることから、現在行われている衛生管理手法の元であっても、健康被害発生を完全に防ぐのは困難であると考えられた。

現行の住肉胞子虫遺伝子検査法に基づき 0.3 g の馬肉を採取し、DNA を抽出、定量 PCR に用いる場合、遺伝子コピー数のばらつきは非常に大きいことがわかった。馬肉 10 g を均質化後、DNA を抽出し、定量 PCR に用いる方法で、よりばらつきの少ない結果が得られた。また、サンプリング量を 10 g、20 g、30 g、40 g と増量した場合のばらつきを推定すると、増量とともに相対標準偏差が低下した。この結果は、遺伝子コピー数のばらつきを減少させるためには、検体から DNA を抽出する前に、多量の検体を均質化することが有効であることを示している。しかしながら、多量の馬肉サンプルを用いて検査することには困難が伴うこともある。単純に増量していくだけではない工夫が求められる。

北海道に生息するエゾシカについて、住肉胞子虫の汚染状況を調査した。その結果、96%のエゾシカ肉中から住肉胞子虫遺伝子が検出され、同胞子虫の汚染が蔓延している危険性が推察された。エゾシカ肉が食用に転用される実績がすでにあり、今後、大きく発展する可能性がある。エゾシカ肉中における住肉胞子虫の危害性を評価する必要がある。

住肉胞子虫は、ウマやシカの筋肉中にシ

ストとして寄生する。住肉胞子虫の寄生は宿主の健康に影響を与えず、シスト中のブラディゾイトは、宿主が死なない限り、シスト内に最大数まで増殖する。ウマやシカの年齢が高まるにつれ、住肉胞子虫の寄生率が上昇することが推察される。また、スポロシストを継続的に摂取すれば、住肉胞子虫の汚染は深刻化する。本報告で示したように、定性 PCR では、エゾシカの年齢と住肉胞子虫寄生との関係は非常に頻度の高いものではあるが、汚染の濃淡は判断できない。年齢との関係も不明である、今後、住肉胞子虫遺伝子の定量的解析をする必要がある。

牛肝臓内の大腸菌の分布とその殺菌法の検討については、当初、牛肝臓内で検出される腸管出血性大腸菌及び大腸菌群細菌は、胆汁に汚染している菌が胆管を通して肝臓内を汚染すると考えていた。しかし、今回得られた結果では、胆汁中の大腸菌群細菌と肝臓内で検出された大腸菌群細菌とは相関性が無く、単純にと畜解体後に胆汁中の菌が肝臓内を汚染しているのではない可能性が示された。*stx* 遺伝子についても同様で、今回調べた範囲で胆汁からは *stx* 遺伝子は全く検出されなかった。肝臓内で *stx* 遺伝子が検出された場合も、非可食部位に相当する 3、4、5 であった。一方、可食部位に相当する 1 と 2 では大腸菌群細菌が検出されたが、その割合は気温の高い夏場に多く、気温の低い冬場に少ない傾向にあった。しかし、*stx* 遺伝子は、夏場、冬場に関わらず検出されなかった。このことは、可食部位に STEC が存在する可能性は低く、

何らかの方法で大腸菌群細菌のみならず腸内細菌科菌群を殺菌することができれば、生食用のレバーが提供できる可能性が考えられる。何故、非可食部位の 3、4、5 で *stx* 遺伝子が検出されたかは、今後の課題である。

放射線照射による微生物除去では、過去研究事例から、*Campylobacter* 属はガンマ線に対する抵抗性は低いことが示唆されてきた。Rocelle らによれば、低脂肪の牛挽肉条件下で本菌の冷蔵下 (3~5℃) および凍結 (-17~-15℃) でガンマ線を照射した場合、その D_{10} 値は 0.175、0.235 と報告されており、本研究ではそれと比較して若干高めに観察された。これは本研究で用いた供試菌の抵抗性が高いというよりも、現在の *Campylobacter* 検出培地の高性能化および微好気培養条件の発達により検出率が改善したためと予想された。しかしながら過去の牛挽肉での研究事例にもあるように、本研究においても大腸菌 0157 株よりも本菌の抵抗性は低く、牛肝臓においてはガンマ線抵抗性の試験指標菌として *Campylobacter* を詳細に検討する必要はないと考えられた。

ガンマ線照射による TBA 価 および脂肪酸含量については、これまでの研究の成果から、微生物の殺滅に必要なガンマ線の量は、冷蔵 6 kGy、凍結 (-80℃) で 10 kGy を超えることは無いと見通せる。トランス異性化については、牛肝臓の脂質含量が 5%未満であることも考慮すると、今回の研究の範囲の最大変化量でも、国際機関の推奨するトランス脂肪酸摂取量 (総摂取エネルギーの 1%未満、1800kcal 摂

取する人のトランス脂肪酸摂取推奨量は2g未満)を考慮すると、照射による牛肝臓のトランス脂肪酸量の増加は、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えないと考えられる。

またLiらは、常温(20℃)での牛挽肉のガンマ線照射において、6.74kGy以上の照射でアラキドン酸(20:4)等の多価不飽和脂肪酸の含量の有意な低下を報告しているが、今回の研究結果からは、飽和脂肪酸の割合の増加や高飽和脂肪酸の減少は認められなかった。2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)の生成については、照射食品中での安全性に関しては多くの議論もあるが、その含量が微量であること、エームス試験等の変異原性試験が陰性であること等を理由に、ヨーロッパ食品安全機関(EFSA)では、照射食品摂取の際の健康影響は無視できると結論している。¹³⁾ また、最近、Yamakageらは2-ドデシルシクロブタノン(2-dDCB)および2-テトラデシルシクロブタノン(2-tDCB)の遺伝毒性を否定した論文を公表し、Satoらも、2-tDCBの発がんプロモーション活性を検出出来なかったとの報告している。ただし、わが国では、照射食品の安全性に関する評価が定まっていないことから、照射により生成する可能性のある2-ACBsを定量的に把握する必要があると考えた。2-dDCBおよび2-tDCBについては、Ndiayeらは6-8℃で照射牛肉中の2-dDCBおよび2-tDCBの生成効率として、1.0 および 1.0 nmole/mole FA/kGyを報告している。また、Marchioniらは、6-8℃で照射した牛肉の、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCBの生成効率を、1.33、1.59、

1.67 nmol/mole/kGyと報告している。今回の肝臓の分析結果は、回収率を60%程度と見込んでも、これらの報告値に比べて、生成効率はやや低めであった。この理由としては、照射温度の違いが大きく影響していることが予測される。いずれにせよ、今回の実験で用いた条件下の牛肝臓の1kGyの照射で、多くの畜肉類で報告されている前駆脂肪酸1mmoleあたり1~2nmoleという生成効率を大きく超えるようなことは無いと判断された。以上より、牛肝臓の脂質含量が牛挽肉等の畜肉に比べて低いことを考慮すると、殺菌に必要な線量が牛挽肉に比べて小さくなったとしても、すでに米国等で許可されている牛挽肉に比べて多量の2-ACBsが照射牛肝臓中に生成することは無いものと予測された。

高圧処理については、昨年度の結果を踏まえて、高圧条件を400MPa~500MPaのような高い圧力ではなく、150~250MPaの比較的低い圧力での*E. coli*の不活化の検討を行った。その結果、150MPaでは有効な殺菌効果は見られなかったが、200MPaから殺菌効果が認められ、特に今回検討した250MPaは処理時間の経過とともに殺菌効果が高まる傾向が認められた。250MPaで180minでは食品媒介病原細菌の低減化に有効な結果が得られ、*P. aeruginosa*, *E. coli* S. Typhimuriumでは5Dの死滅効果がみられ、さらに*S. Enteritidis*, *P. alcalifaciens*, *C. sakazakii*, *Y. enterocolitica*では6D以上の殺菌効果が得られた。一方、実際の肝臓に*E. coli*を接種して高圧処理

(250MPa で 180min)を行った結果では、2 D 程度の死滅効果しか得られなかった。緩衝液に懸濁した殺菌効果と肝臓に接種した実験結果ではかなり異なる結果となり、さらに処理条件である圧力と処理時間の検討が必要であると思われた。肝臓の物理的な肉質に関連して 150～250MPa で 60 分、120 分、180 分処理を肝臓に施したところ、肉色については 150MPa から 200MPa、200MPa から 250MPa と高い圧力になるほど明るい色調を示した。500MPa の高い圧力に比べて色調の変化は少なく、良い肝臓の色調を維持し、やや赤みがかかった色合いであった。肝臓の硬さについては、250MPa 処理を行うと硬さの数値は高くなる傾向が見られるものの、未処理のものに比較してやや硬くなる傾向が認められているが、生肝臓と比較しない限り明瞭な違いは見られなかった。

高圧処理は肝臓中の *E.coli* (腸管出血性大腸菌) のリスク低減には有効と考えられるが、これらの高圧条件に更なる有効な殺菌方法を組み合わせた処理法の検討が必要であると考えられた。一方、生レバーとしての食味と食感は異なることとなり、生レバーとしての価値が見いだせるものか不明瞭で検討の必要があると考えられる。肝臓の物理的な変化は従来の 400MPa～500MPa の圧力と異なり、比較的穏和な処理のため肝臓の色合いや柔らかさは残存し有効であると考えられた。最終的には専門的な官能検査も必要となると考えられた。以上のことから、250MPa で 180 分の高圧処理は、肝臓のそのものは顕著な肉色や肉質の変化は認められなかったものの、やや *E. coli* に対する不

活化効果は十分ではない結果となった。今後は加圧処理時間の延長やさらなる不活化データの構築も必要と考えられた。最終的には実際に腸管出血性大腸菌を用いた殺菌効果の検討や製造工程においても一貫した衛生管理システムの導入が必要であると考えられた。

E. 結論

海外で販売されている生食用食肉製品の衛生管理について、昨年度の調査でドイツにおいて流通販売されていることが明らかとなった豚肉生食製品であるメットの衛生管理及び規格基準についての情報を収集した結果、メットを対象とした微生物規格基準は存在しておらず、連邦政府による挽肉の加工要件が規定されており、その遵守を州が監視、モニタリングすることが定められていることが明らかとなった。一方で、サルモネラ、カンピロバクター及び寄生虫等を原因物質とする健康被害の報告がドイツで見られ、現行の衛生管理対策でも完全に健康被害の発生を防ぐのが困難であることが示唆された。

畜産食品を汚染する危害の一つである *Sarcocystis* 属住肉胞子虫について、馬肉からの PCR 法による検出とエゾシカ肉の住肉胞子虫汚染調査を行った。住肉胞子虫の存在が確認された馬肉から 10 g、あるいは現行検査法で指定している 0.3 g を採取して、18S rRNA 遺伝子コピー数について検討したところ、均質化した馬肉量が 0.3 g の場合には陰性だったサンプルでも、10 g の均質化液の DNA を用いる

と標的遺伝子の増幅反応が検出された。均質化する馬肉量を増量し、DNA を抽出することにより、住肉胞子虫遺伝子検査法を改良できると考えられた。また、シカ肉 50 検体について、住肉胞子虫の汚染率を調査したところ、48 検体に住肉胞子虫遺伝子を検出したため、今後食中毒危害性を評価する必要があると思われた。

牛肝臓内の大腸菌群汚染は、単純にと畜解体後の細菌汚染でなく、現在は不明であるが別の理由が考えられる。牛の肝臓内の大腸菌群細菌による汚染は、気温の高い夏場に多く、気温の低い冬場に少ない傾向にあった。さらに、通常生レバーとして提供される可食部位では検出される大腸菌群細菌数、陽性率も低く *stx* 遺伝子は検出されなかった。

牛肝臓内部に接種した *C. jejuni* 5096 株の D_{10} 値は、氷冷 (0°C) 脱気条件で 0.33 kGy、凍結 (-80°C) 脱気条件で 0.69 kGy であった。また、非照射試料を凍結し融解する操作で約 1 桁の菌数低減があった。これらの結果を前年までの結果と合わせると、ガンマ線殺菌の効果を判定する指標菌としては、その放射線感受性の点から *Salmonella* を選択することが適切と判断された。

冷蔵 6kGy、冷凍 10 kGy までの照射で、不飽和脂肪酸の有意な減少は無かったが、照射によるトランス異性化が認められ、トランス酸含量は僅かに増加した。含気包装と脱気包装の違いによる影響は少なかった。脂質の放射線分解物である 2-アルキルシクロブタノン類として、2-dDCB、

2-tDCB、2-tDeCB の照射による線量依存的な生成を確認した。生成量は包装条件の違いによる影響は少なく、前駆脂肪酸 1mmole から 1kGy の照射で生成する 2-ACBs のこれまでに牛肉で報告されている効率と同程度かそれ以下であった。

フランについては、冷蔵(0°C)、冷凍(-80°C)の含気条件かで、殺菌効果を得るより十分大きな線量である 6kGy、10 kGy で照射をしても、定量下限を超える濃度のフランは検出されないことを確認した。

250MPa で 180 分の高圧処理は、食品媒介病原細菌の菌数低減には有効であった。牛肝臓に対する影響は、色や硬さの面やや赤みや硬さの変化が認められるものの一定の評価が得られた。次年度は更なる有効な殺菌データの構築が必要で、特に相乗効果により病原菌のリスク低減のための検討を進める予定である。

F. 健康危機情報
特になし

G. 研究発表
論文発表

1. 等々力節子, 川崎晋, 放射線殺菌, 食品衛生学雑誌, 55(6)J215-218(2014)
2. 鎌田洋一他, 2014. 厚生労働省食中毒統計にみる寄生虫性食中毒. 食品衛生研究 投稿中。

学会発表
なし

講演・研修会等

1. 等々力節子，放射線殺菌，第 107 回
日本食品衛生学会学術講演会シンポジウ
ム H26. 5.16

H. 知的財産権の出願，登録状況
特になし

平成 26 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の安全性確保に関する研究

分担研究報告書

海外における生食用食肉製造時の衛生管理実態に関する研究

研究分担者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：初年度の本研究において、我が国における畜産食品の生食における衛生管理上の参考とする目的で、諸外国における食肉及び内臓肉の生食実態を行ったところ、ドイツにおいて容器包装後、スーパー等で製品として販売されている生食用食肉製品としてメットが販売されていることが明らかとなった。今年度の本研究では、メット製造時の衛生管理の実態、販売時の微生物成分規格の有無等についての実態調査を行った。その結果、ドイツにおいてメット独自の微生物成分規格はなく、ひき肉製品の製造加工要件が定められており、その遵守については連邦ではなく州レベルでの監視・モニタリングが行われていることが明らかとなった。一方で、過去数年にわたり、ほぼ毎年メットによるサルモネラ、カンピロバクター、ノロウイルス及び寄生虫性食中毒が発生していた。

A. 研究目的

日本国内での食文化の多様化から、近年牛、馬、鶏などの畜産食品の生食が行われるようになってきており、それに伴う食中毒の発生もしばしばみられている。また、牛肝臓の生食が規制され、豚の肝臓等の生食が一部に広まりつつあることから、新たな健康被害についても懸念される事態となっている。本研究では、国内における畜産食品の衛生管理、加工基準、微生物規格等について検討するための参考として、海外における生食用食肉製造時の衛生管理実態と生食による健

康被害の実態を把握するための調査を行った。

B. 研究方法

(1) 調査

株式会社三菱総合研究所への委託事業として、文献調査、インターネットを通じた調査及び在日大使館への聞き取り調査を通じて、ドイツにおける豚肉の生食製品であるメットの製造工程における衛生管理実態及び健康被害について情報を収集し、その結果について検討した。

C. 結果

(1) ドイツにおける畜産物製造上の衛生管理実態

委託報告書を巻末に示した。EU 加盟国であるドイツは、EU 食品安全法に適合する形で食品安全対策を実施しており、連邦レベルで食品・飼料安全を包括的に所管する機関として連邦食糧・農業省 (BMEL) があり、その下部組織に連邦消費者保護・食品安全庁 (BVL)、連邦リスク評価研究所 (BfR)、連邦農業・食品局 (BLE)、その他研究機関 (FLI, JKI, MRI) が設置されている。その他、一部領域については、連邦環境自然保護原子力安全省 (BMUB)、連邦財務省 (BMF) および連邦司法消費者保護省 (BMJV) がそれぞれ管轄している。動物由来食品に関する連邦レベルの法令である動物由来食品衛生規則において、ひき肉の製造及び取扱いに関する要件が定められており、製造加工施設、原材料肉 (認可された解体施設からの新鮮な骨格筋のみを使用し、くず肉を使用してはならない)、製造前後の衛生管理 (家禽肉は 4℃、内臓肉は 3 度、その他の肉は 7℃以下で加工する。製造後には挽肉は 2℃、肉製品は 4℃以下で冷蔵するか -18 度以下で冷凍する) が定められていた。また、法令遵守に対する公的な監視や食品モニタリングプログラムは各州の責任において実施されており、実際に監視を行うのは州の下にある地方自治体である郡あるいは郡独立市の獣医局等であった。食品企業や飲食店等の監視項目としては、設備、作業方法、衛生要件の遵守、トレーサビリティ、企業の自己検査、表示・宣伝等があった。その他、農場段階での監視としては、動物衛生・福祉や飼料

に関する法令の遵守状況についてチェックを行っていた。企業や事業所に対する監視活動については、連邦レベルで統一的な枠組みが規定されており、企業や事業所への立入検査の頻度を決定する算定方法が示されていた。「I 企業の種類 (製品の取り扱い・製品のリスク)」「II 企業の様子 (法令遵守・トレーサビリティ・従業員訓練)」「III 自己検査システムの信頼性 (HACCP、製品の検査、温度 (冷却) の遵守)」「IV 衛生管理 (建築上の基準・洗浄と消毒・従業員の衛生・生産衛生・害虫駆除)」の 4 つの基準に基づいて算出したスコアに従って 9 つのリスククラスに分類され、監視頻度が決定される。各州はこの算定方法の結果に基づき、企業や事業所への立入検査を実施していた。また、メット製造業者は衛生管理に関して外部認証を取得しており、出荷前の自主検査と共に外部監査機関での検査も実施していることが明らかとなった。

(2) ドイツにおけるメットの喫食による健康被害の実態

2007 年から 2012 年にかけて、メットの生食による健康被害の報告が 14 件見られた。また、塩漬け及び燻製豚肉製品による事例は 4 例、カモ肉の生食による事例が 1 例見られた。その原因物質は、メットの生食によるものではサルモネラ、カンピロバクター、寄生虫 (サルコシスティス)、ノロウイルスであった (巻末 委託報告書)。塩漬け及び燻製豚肉製品による事例では、ボツリヌス、サルモネラ、寄生虫 (旋毛虫) であり、鴨肉の生食ではカンピロバクターを原因としていた。また、メットによる食中毒 14 件中 5 件では、原料に

生卵を用いており、原因菌が生卵から検出された例も 1 例見られた。

D. 考察

昨年度の研究で、諸外国における畜産物生食実態の調査を行った結果、ドイツのメットについては、容器包装されスーパー等で市販されていることが明らかとなったため、日本国内での畜産食品の衛生管理等に参考とする目的で、今年度はメットの衛生管理及び規格基準についての情報を収集した。ドイツにおいてメット独自の公的な微生物成分規格はなく、ひき肉製品の製造加工要件が定められており、その遵守については連邦ではなく州レベルでの監視・モニタリングが行われていることが明らかとなった。また、製造販売業者は衛生管理に関して外部認証を取得しており、出荷前の自主検査と共に外部監査機関での検査も実施していることが明らかとなった。一方で、近年においてもドイツでメットの喫食によるサルモネラ症及び旋毛虫症等の発生が見られていることから、現在行われている衛生管理手法の元であっても、健康被害発生を完全に防ぐのは困難であると考えられた。

E. 結論

今年度は、昨年度の調査でドイツにおいて流通販売されている豚肉生食製品であるメットの衛生管理及び規格基準についての情報を収集した。その結果、メットを対象とした微生物規格基準は存在しておらず、連邦政府による挽肉の加工要件が規定されており、その遵守を州が監視、モニタリングすることが定められていることが明らかとなった。一方で、サルモネラ、カンピロバクター及び寄生虫等を原因物質とする健康被害の報告がドイツで見られ、現行の衛生管理対策でも完全に健康被害の発生を防ぐのが困難であることが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

平成26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）
畜産食品の安全性確保に関する研究

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）

分担研究報告書

畜産食品が原因の寄生虫性食中毒に関する研究：
遺伝子検査法の検証とエゾシカ肉中の住肉胞子虫汚染調査

分担研究者 鎌田 洋一 （岩手大学農学部 共同獣医学科）

協力研究者 白藤 由紀子 （岩手大学農学部 共同獣医学科）

佐藤 弘隆 （岩手大学農学部 共同獣医学科）

畜産食品を汚染する危害の一つとして *Sarcocystis* 属住肉胞子虫の寄生がある。同寄生虫は、一過性の下痢を誘発することが証明されている。厚生労働省は、同寄生虫の暫定的検査法を通知した。同通知法における住肉胞子虫遺伝子検査法は定性 PCR 法を用い、また、少量のサンプル量であるため、検査の確実性に劣る懸念がある。また、定量的な遺伝子検査法の確立が望まれる。野生のエゾシカは、今後広く畜産食品として喫食されることが予想される。エゾシカ肉の住肉胞子虫汚染調査を行った。

S. fayeri の存在が確認された馬肉から 10 g、あるいは現行検査法で指定している 0.3 g を採取して、均質化し、それぞれの懸濁液 0.2 ml から DNA を抽出した後に、18S rRNA 遺伝子コピー数について検討した。均質化した馬肉量が 0.3 g の場合には陰性だったサンプルでも、10 g の均質化液の DNA を用いると標的遺伝子の増幅反応が検出された。また 0.3 g から DNA を得る方法で陽性だったサンプルについて、10 g から得た DNA を用いると 0.3 g の場合に比べ、より少ない相対標準偏差を示した。

均質化する馬肉量を増量し、DNA を抽出することにより、住肉胞子虫遺伝子検査法を改良できると考えられる。

エゾシカ肉 50 検体について、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子共通配列を標的に定性 PCR を行い、同寄生虫の汚染率を調査した。方法は馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法に準じた。48 検体に住肉胞子虫遺伝子を検出した。エゾシカは広く住肉胞子虫の寄生を受けており、今後、食中毒危害性を評価する必要がある。

A. 研究目的

馬肉の喫食後数、時間で一過性に下痢や嘔

吐などの消化器症状が起こり、その後短時間

で回復する事例が発生している。これまでの

研究で食中毒症状の原因が、馬に寄生する *Sarcocystis fayeri* (以下、*S. fayeri*) であることが明らかになっている (1、2、3)。*S. fayeri* は馬を中間宿主、犬を終宿主としている住肉胞子虫である (1、3、4)。終宿主から排泄されたスポロシストが牧草等を汚染し、餌とともに取り込まれ、メロゴニー、その後目視できるほど大きな、多数のブラディゾイトを含むシストを筋組織に形成する。馬が終宿主に捕食され、シスト内のブラディゾイトが腸管上皮細胞でガメートゴニー、ザイゴート、その後オーシストを形成し、スポロシストとして排泄される。

馬肉喫食による有症苦情事例を検査する際に指針とされているのが、厚生労働省から通知されている遺伝子検査と顕微鏡検査を用いた検査法である。遺伝子検査は以下のように実施する。馬肉サンプルから肉片を 3 か所切り出し、刃物でミンチ状にする。0.3 g のミンチを採取し、TE Buffer で 1 mL にメスアップ、30 秒間激しく攪拌し、3000 rpm で 5～6 秒間、遠心分離をする。上清 200 μ L を採取し、市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。市販の PCR 用試薬キットを用いて、定性 PCR 陽性対象と抽出 DNA の定性 PCR を行い、結果をアガロース電気泳動によって確認する。住肉胞子虫 18S リボゾーム RNA 遺伝子 (以下、18S rRNA と略) を検出する定性 PCR 法である。rRNA は RNA の一種であり、その塩基配列が種の同定や分類に利用されている。定性 PCR 陽性対象において約 1100 bp の遺伝

子増幅を確認し、検体 DNA サンプルで遺伝子増幅が見られた場合、定性 PCR 陽性と判断する。検体が PCR 陽性と判定された場合に顕微鏡検査を実施する。

厚生労働省通知に基づく住肉胞子虫遺伝子の検査法は、サンプリングされた馬肉中のシストの有無が、結果に大きく影響してくる。シストが局在し、その中に極めて多量のブラディゾイトが含まれ、分布の差が著しい。現行検査法はサンプリング量が少量であるため、確実性に劣る懸念があり、安定かつ定量的な遺伝子検査法の確立が望まれる。

馬肉と同様に位置付けられる畜産食品として、シカ肉がある。「鹿刺し」と称され、馬刺し同様に喫食されてきた我が国の食文化の一つとして位置づけられる。シカは現在、家畜として管理肥育しているわけではなく、野生に生息しているシカを捕獲し、食品として提供される。そのため、既知および未知の病原体が捕獲シカに含まれる。したがって、何らかの制御がなければ人が喫食し、食中毒危害性を示す危険性を有する。一方、野生鳥獣肉はジビエと称され、最近注目されており、有害野生動物の駆除と関連して、今後、シカ肉を含めた野生動物肉は、畜産食品として我が国に普及してゆくと予想する。そのため、シカ肉の危害性を調査することは重要となる。その危害の 1 種として、住肉胞子虫がある。2012 年に、エゾシカ肉を喫食しての、有症苦情事例が起こり、シカ肉中に住肉胞子虫の 1 種が発見された (5)。シカ肉中の住肉胞子虫の危

害性が具体的に示された事例となり、住肉胞子虫調査の必要性が明瞭となった。

予備試験の結果、シカ肉中の住肉胞子虫の遺伝子は、*S. fayeri* 遺伝子検査法が適応できることが明らかとなった。

本研究では同遺伝子検査法について、定量的な PCR 法を適応するのに加え、サンプリングする馬肉量について検討した。*S. fayeri* 遺伝子コピー数を、ばらつきが少なく、かつ、定量的に検出する遺伝子検査法を確立することを目的とした。さらに、市販エゾシカ肉中の住肉胞子虫汚染を、遺伝子検査法を用いて調査した。

B. 研究方法

B-1. 馬肉と住肉胞子虫遺伝子検査法

本研究に用いた馬肉サンプルは、7 検体分の横隔膜を株式会社 千興ファーム（熊本県）から購入した。馬肉検体は 1～7 の番号を付けて管理した。

S. fayeri 遺伝子陽性、陰性の判定を行った。現行検査法（6）に基づき、DNA を抽出し、各検体から 0.3 g を 2 か所採取し、ミンチ状とした。TE Buffer でミンチしたサンプルを回収し、1 mL にメスアップした後、30 秒間激しく攪拌、3000 rpm で 5～6 秒間、遠心分離した。上清 200 μ L を取り、DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。手順は Kit 付属のプロトコールに従った。抽出した DNA を用いて、定性 PCR を行った。プライマーは厚生労働省通達の現行検査法で使

用されているものを用いた（表 1）。定性 PCR の PCR 条件は 94°C、3 分を 1 ステップ、94°C、30 秒、53°C、30 秒、1 分を 30 サイクル、72°C、5 分を 1 ステップとした。用いた試薬は 10×Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa) である。得た PCR 産物について、当研究室保有の *S. fayeri* 遺伝子陽性コントロールとともに、Mupid-2 plus (ADVANCE) でアガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動には 2 %アガロースゲルを用いた。DNA サイズマーカーは 100bp plus DNA ladder (BIO CRAFT)、試薬は 6x GR Green Loading Buffer (BIO CRAFT) を用いた。電気泳動後、イルミネーター (TYPE-FX II、ATTO) で結果を観察した。約 1100 bp の遺伝子増幅産物が確認されたものを陽性と判定した。

遺伝子陰性と判定された 1 検体と陽性と判定された 2 検体で、定量 PCR を行った。各検体から、現行法に基づき 0.3 g の馬肉を 2 か所採取し、前述の方法と同様に DNA を抽出した。また、同じそれぞれの検体から、馬肉を 10 g（図 1）、2 か所採取し、ぶつ切りにしたものに PBS 30 mL を加え、ホモジナイザー (Excel Auto Homogenizer, NiSSEi) で均質化した（図 2）。均質化後、粥状になった馬肉サンプルを 200 μ L 採取し、DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。手順はキット付属のプロトコールに従った。抽出した DNA を用いて定量 PCR を行った。使用したプライマーは、八木田 健司 博士 (国立感染症研究所) が設計した *Sarcocystis* 属共

通遺伝子配列を利用したプライマーを参考に作成した (表 2)。また、定量 PCR の PCR 条件は 95°C、10 分を 1 ステップ、95°C、30 秒、60°C、1 分を 45 サイクルとした。用いた試薬は GeneAmp SYBR qPCR Mix α (NIPPON GENE) である。StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems) で実験をした。NIPPON GENE から供与された *S. fayeri* 遺伝子陽性コントロールを用いて、絶対定量を行った。

遺伝子陽性と判定された検体から、馬肉 0.3 g を 8 か所、馬肉 10 g を 8 か所採取した。前述の方法と同様に DNA を抽出し、遺伝子定量用のプライマー で定量 PCR を行った。PCR 条件は 95°C、10 分を 1 ステップ、95°C、30 秒、60°C、1 分を 45 サイクルとした。また、この結果を用いて、馬肉 10 g 均質化検体に 1 ～ 8 の番号をつけ、乱数発生ソフトウェア (<http://tools.huu.cc/rand/>) によって乱数を発生させ、馬肉を 20 g、30 g、40 g 用いて実験をした場合の相対標準偏差 (以下、rSD) を推察した。馬肉 20 g を用いた場合の実験結果を推察する場合、2 つの乱数を 8 回発生させ、出た乱数の番号の検体遺伝子コピー数に基づき標準偏差 (以下、SD) および rSD を算出した。

B-2. エゾシカ肉の住肉胞子虫遺伝子検査

エゾシカ肉 50 検体 (横隔膜部分) は北海道のシカ肉販売業者より分与を受けた。各シカの推定年齢を調査した。

エゾシカ肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法は、

厚生労働省が通知した *S. fayeri* 定性遺伝子検査法を適応した。PCR 産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子陽性か否か判断した。

C. 研究結果

C-1 馬肉の住肉胞子虫遺伝子検査法改良の検討

定性 PCR 遺伝子増幅の結果から馬肉 No.1 ～ 7 のうち、1 番は採取した 2 か所とも遺伝子増幅は確認されなかった (図 3)。検体 2 番および 7 番は 2 か所採取したうち、片方のみ遺伝子増幅が確認された。また、3 ～ 6 番では採取した両方で遺伝子増幅が確認された。これらの結果から、1 番の馬肉検体は *S. fayeri* 遺伝子陰性、2 ～ 7 番の馬肉検体は *S. fayeri* 遺伝子陽性と判断した。遺伝子増幅は、約 1100 bp の位置にバンドが確認でき、目標遺伝子増幅産物が得られていることが確認された。

S. fayeri 遺伝子陰性検体 1 番と陽性検体 3 番および 4 番を用いて定量 PCR を行った。馬肉 0.3 g を用いる方法と 10 g を均質化して検査に供する方法の比較を行った (表 3)。遺伝子陰性と判定された 1 番の検体で、馬肉 0.3 g を用いる方法では遺伝子増幅が検出されなかったが、馬肉 10 g を用いる方法では遺伝子増幅が検出された。また、3 番および 4 番の検体では、馬肉 10 g を均質化する方法で、0.3 g を用いる方法より低い rSD が得られた。

陽性検体 3 番から馬肉 10 g を 8 か所採取し、均質化後、DNA を抽出した。陽性検体 7 番か

らは馬肉 0.3 g を 8 か所採取し、現行検査法と同様に DNA を抽出した。それぞれの抽出 DNA を用いて定量 PCR を実施した (図 4)。馬肉 10 g を均質化する方法では、馬肉 0.3 g を用いる方法よりも、低い rSD を示した。乱数発生ソフトウェアを用いた解析の結果では、想定サンプル馬肉量を増量することで、標準偏差および相対標準偏差がともに低下した (表 4)。

C-2 エゾシカ肉における住肉胞子虫汚染状況

厚生労働省が通知した住肉胞子虫遺伝子定性検査法が妥当かどうか、シカ肉よりシストを取り出し、DNA 抽出を行った。住肉胞子虫遺伝子定性 PCR を、抽出 DNA に適応したところ、明瞭に遺伝子増幅が確認された (図 5)。以上の結果は、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子定性検査法が、シエゾシカ肉中の同寄生虫遺伝子検査に適用できることを示している。

エゾシカ肉より DNA を抽出し、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子共通配列について、PCR を行った。50 検体の PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像の結果を図 6-1~6-4 に示す。50 検体のうちの 48 検体から、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子の増幅が確認された。

エゾシカの推定年齢と、遺伝子陽性率との関係を表 5 に示す。遺伝子陽性率が非常に高いため、推定年齢との関係は不明だった。

D. 考察

現行の住肉胞子虫遺伝子検査法に基づき 0.3 g の馬肉を採取し、DNA を抽出、定量 PCR に用いる場合、遺伝子コピー数のばらつきは非常に大きいことがわかった。馬肉 10 g を均質化後、DNA を抽出し、定量 PCR に用いる方法で、よりばらつきの少ない結果が得られた。また、サンプリング量を 10 g、20 g、30 g、40 g と増量した場合のばらつきを推定すると、増量とともに相対標準偏差が低下した。この結果は、遺伝子コピー数のばらつきを減少させるためには、検体から DNA を抽出する前に、多量の検体を均質化することが有効であることを示している。しかしながら、多量の馬肉サンプルを用いて検査することには困難が伴うこともある。単純に増量していくだけではない工夫が求められる。

北海道に生息するエゾシカについて、住肉胞子虫の汚染状況を調査した。その結果、96% のエゾシカ肉中から住肉胞子虫遺伝子が検出され、同胞子虫の汚染が蔓延している危険性が推察された。エゾシカ肉が食用に転用される実績がすでにあり、今後、大きく発展する可能性がある。エゾシカ肉中における住肉胞子虫の危害性を評価する必要がある。

住肉胞子虫は、ウマやシカの筋肉中にシストとして寄生する。住肉胞子虫の寄生は宿主の健康に影響を与えず、シスト中のブラディゾイトは、宿主が死なない限り、シスト内に最大数まで増殖する。ウマやシカの年齢が高まるにつれ、住肉胞子虫の寄生率が上昇するこ

とが推察される。また、スポロシストを継続的に摂取すれば、住肉胞子虫の汚染は深刻化する。本報告で示したように、定性 PCR では、エゾシカの年齢と住肉胞子虫寄生との関係は非常に頻度の高いものではあるが、汚染の濃淡は判断できない。年齢との関係も不明である、今後、住肉胞子虫遺伝子の定量的解析をする必要がある。

E. 参考文献

- 1) 斉藤 守弘. *Sarcocystis fayeri* 感染馬肉による食中毒. 2012. 獣医疫学雑誌. 16(2), 114-125
- 2) 鎌田 洋一. *Sarcocystis fayeri* を含んだ馬肉による食中毒. 食品衛生研究. 61.11, 21-27. 2011.
- 3) Dubey, J.P., Streitl, R.H., Stromber, P. Toussan, C.M.J. *Sarcocystis fayeri* sp. n. From the horse. J. Parasitol. 63, 443-447. 1977.
- 4) Fayer, R., Dubey, J. P. Development of *Sarcocystis fayeri* in the equine. J. Parasitol. 68, 856-860. 1982.
- 5) 青木佳代、石川和彦、林 賢一、斉藤守弘、小西良子、渡辺麻衣子、鎌田洋一：シカ肉中の *Sarcocystis* が原因として疑われた有症苦情、食品微生物学雑誌、90、28-32、2013.
- 6) *Sarcocystis fayeri* の検査法について (暫定版)
- 厚生労働省 .
http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110823_01.pdf

F. 研究発表

- 1) 鎌田洋一他、2014. 厚生労働省食中毒統計にみる寄生虫性食中毒. 食品衛生研究 投稿中。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案取得
なし。
3. その他
なし。



図1. 馬肉サンプリング量 10 g (左)と 0.3 g (右)



図2. 実験に使用したホモジナイザー (Excel Auto Homogenizer, NiSSEi)

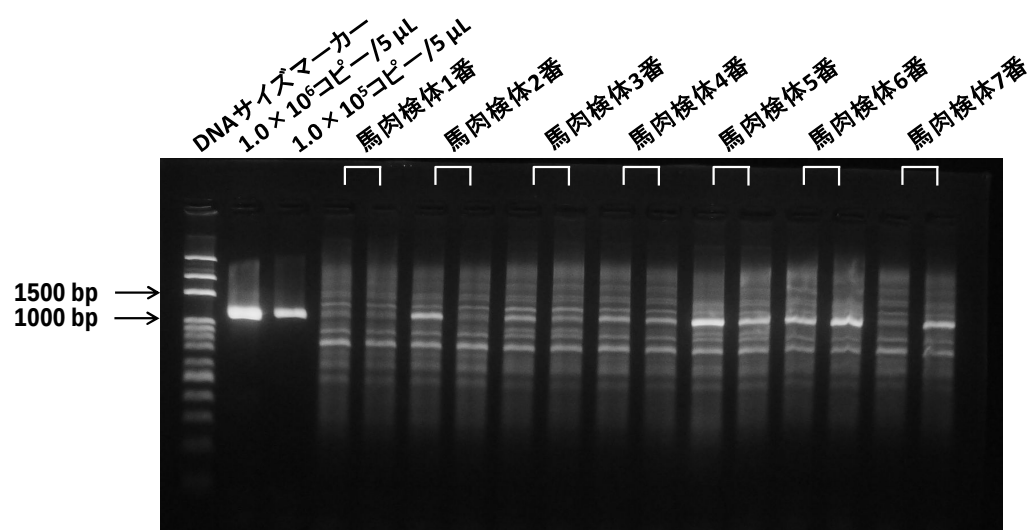


図3. 馬肉の *Sarcocystis fayeri* 18S rRNA 遺伝子検出定性 PCR

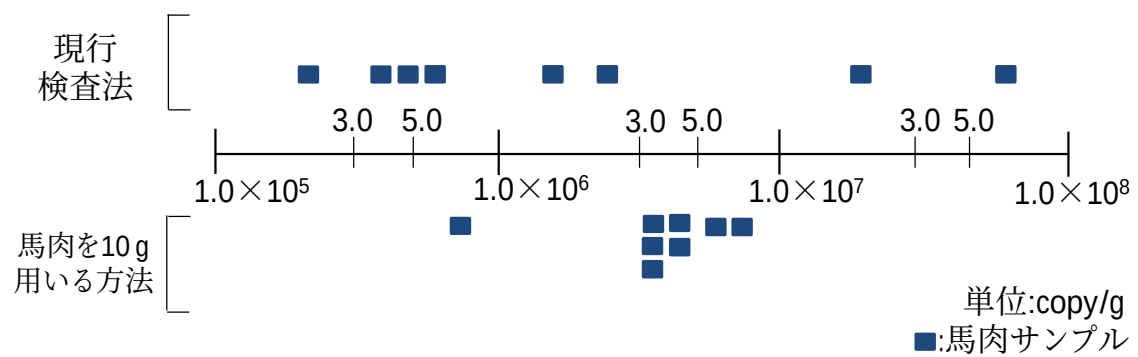
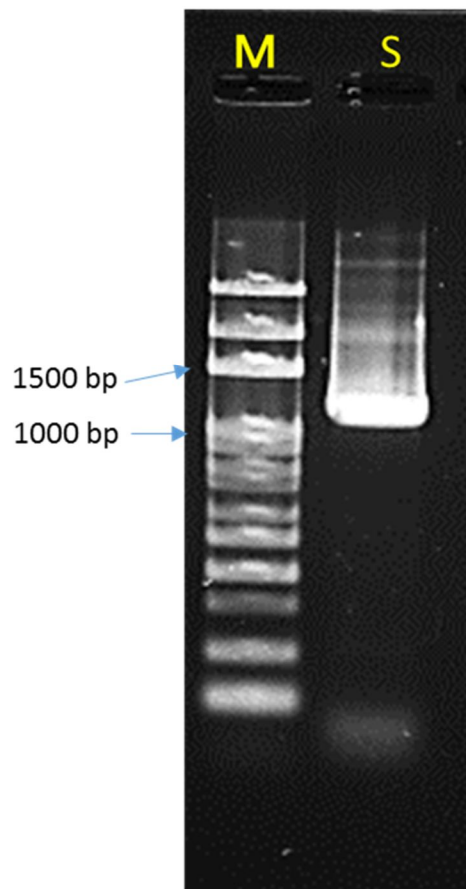


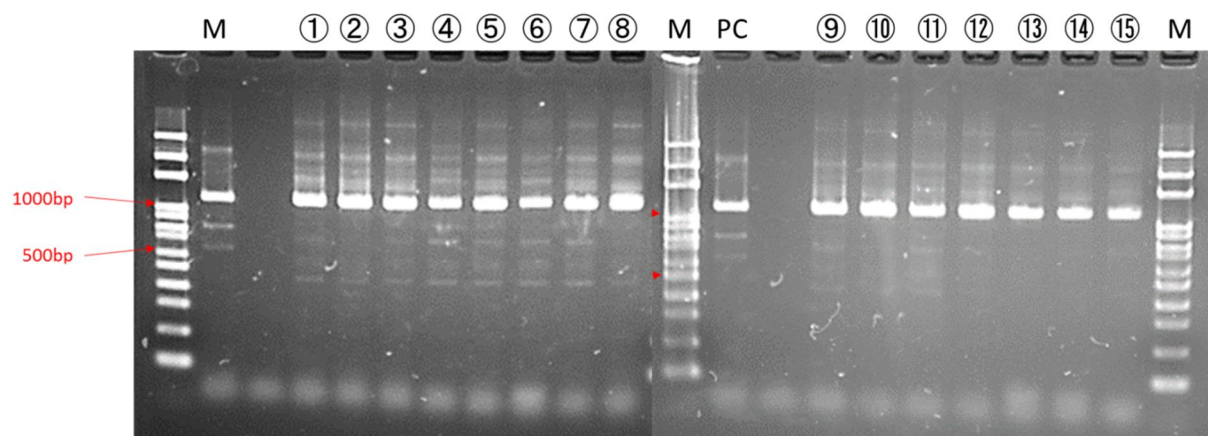
図4．現行検査法および馬肉 10 g 用いる方法での定量 PCR の結果のばらつき



M₁ : 100bp Plus DNA Ladder

S: Sarcocystis

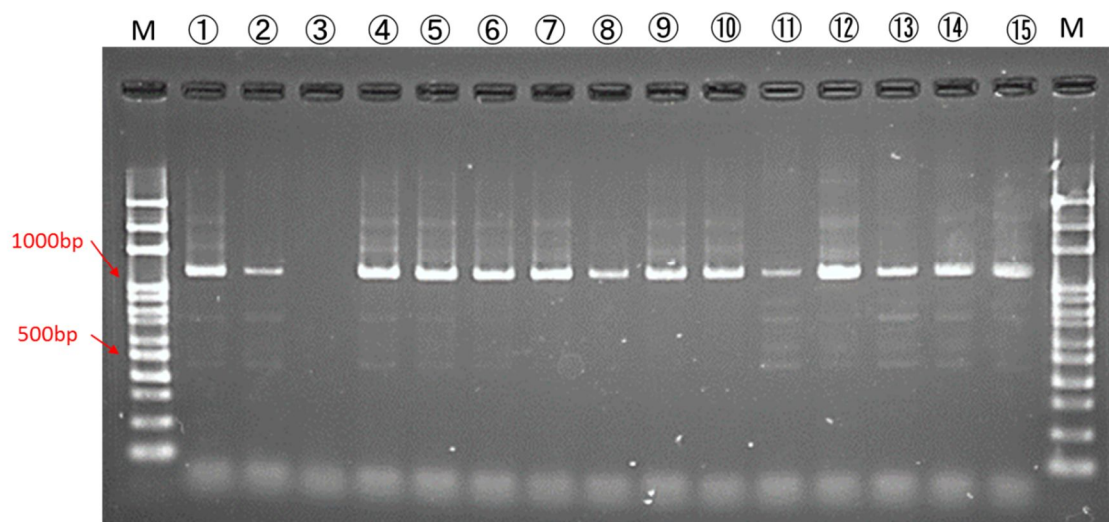
図5. エゾシカ肉より分離した単一シストから抽出した DNA の
馬肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査法への適応



M: Marker PC: Sarcocystis cyst

- | | | | |
|--------------|--------------|---------------|---------------|
| ①: deer No.1 | ⑤: deer No.5 | ⑨: deer No.9 | ⑬: deer No.13 |
| ②: deer No.2 | ⑥: deer No.6 | ⑩: deer No.10 | ⑭: deer No.14 |
| ③: deer No.3 | ⑦: deer No.7 | ⑪: deer No.11 | ⑮: deer No.15 |
| ④: deer No.4 | ⑧: deer No.8 | ⑫: deer No.12 | |

図6-1 エゾシカ肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査



M : 100bp Plus DNA Ladder

①: deer No.16

⑤: deer No.20

⑨: deer No.24

⑬: deer No.28

②: deer No.17

⑥: deer No.21

⑩: deer No.25

⑭: deer No.29

③: deer No.18

⑦: deer No.22

⑪: deer No.26

⑮: deer No.30

④: deer No.19

⑧: deer No.23

⑫: deer No.27

図6－2 エゾシカ肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査

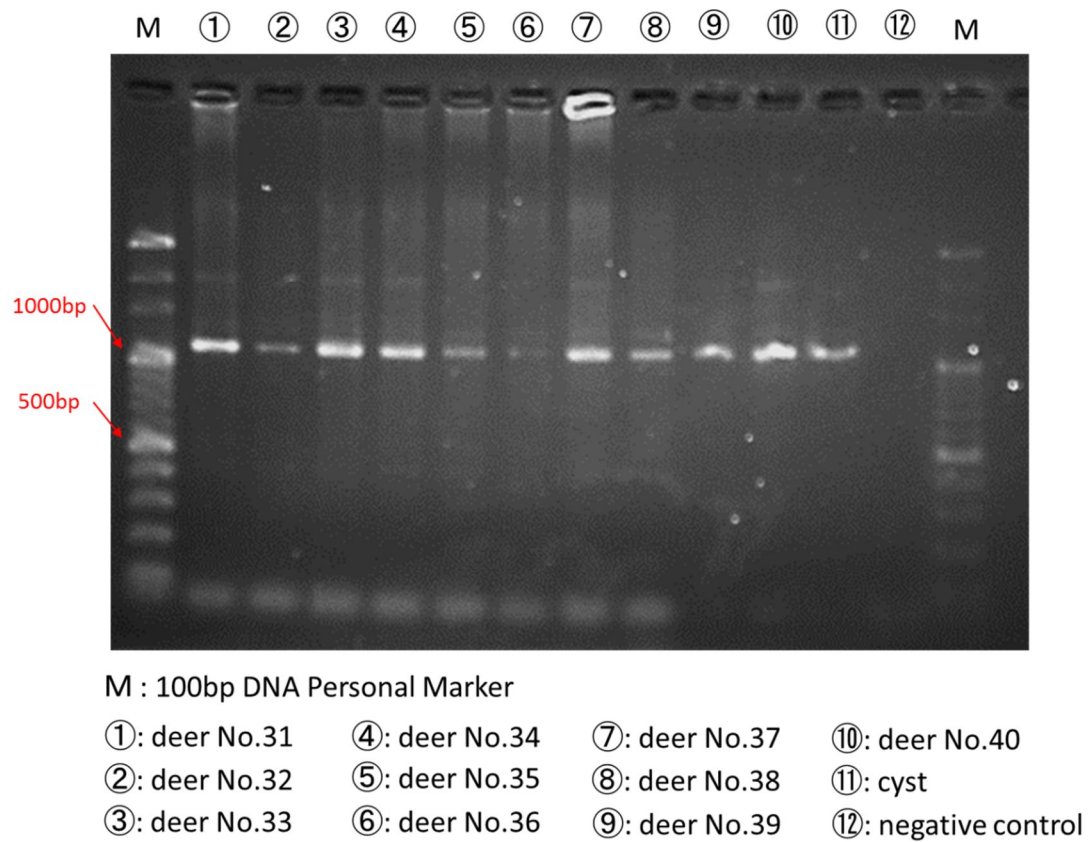
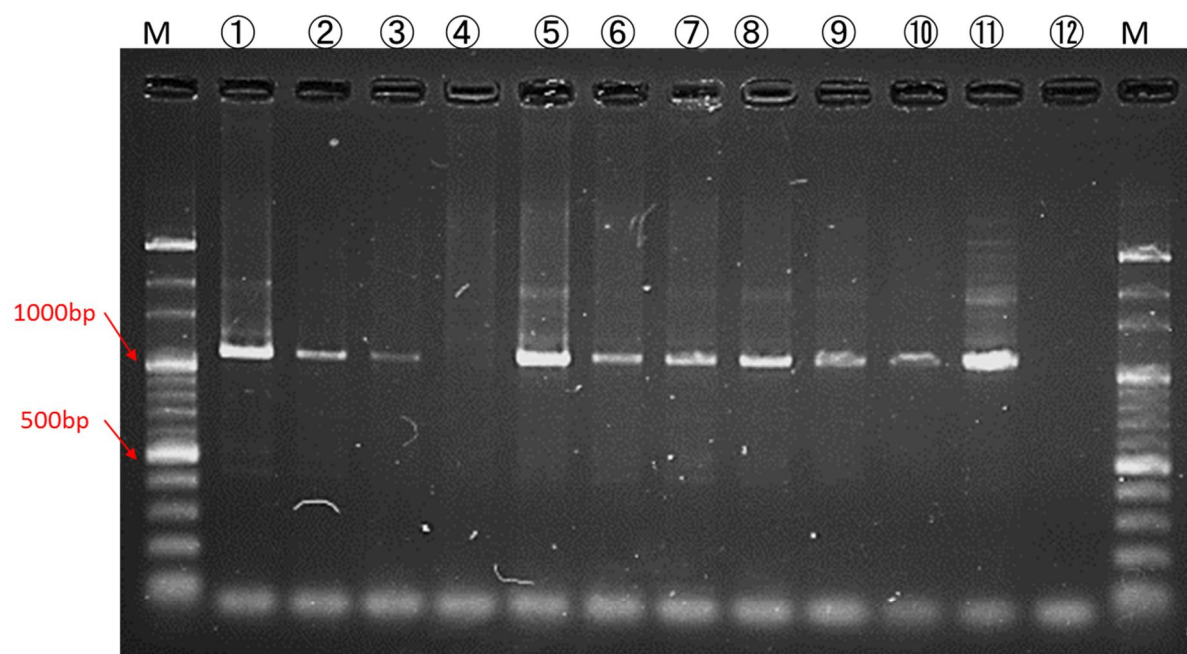


図6－3 エゾシカ肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査



M : 100bp DNA Personal Marker

①: deer No.41	④: deer No.44	⑦: deer No.47	⑩: deer No.50
②: deer No.42	⑤: deer No.45	⑧: deer No.48	⑪: cyst
③: deer No.43	⑥: deer No.46	⑨: deer No.49	⑫: negative control

図6-4 エゾシカ肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査

表 1. 定性 PCR で用いた *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子を検出用プライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物 サイズ (bp)
<i>Sarcocystis</i> 18S-1F	GGATAACCGTGGTAATTCTATG	約 1100
<i>Sarcocystis</i> 18S-11R	TCCTATGTCTGGACCTGGTGAG	

表 2. 定量 PCR で用いた *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子を検出用プライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物
		サイズ (bp)
<i>Sarcocystis</i> qRT-1F	GATACAGAACCAATAGGGACATCAC	140
<i>Sarcocystis</i> qRT-3R	ACTACCGTCGAAAGCTGATAGG	

表 3. 現行検査法と馬肉 10 g を均質化する方法での定量 PCR

Sample No.	現行検査法			馬肉 10 g を用いた方法		
	18S rRNA gene (copy/g)	SD	rSD	18S rRNA gene (copy/g)	SD	rSD
1	1*	Undetected	---	10304000	7277790	141.1%
	2*	Undetected		11651		
3	1*	1898497	33.5%	13265600	5326494	31.4%
	2*			20798400		
4	1*	1854628	32.6%	13830400	712763.6	5.0%
	2*			14838400		

*1 サンプルあたり duplicate で実験し、SD および rSD を算出した。

表 4. 馬肉中住肉胞子虫定量的遺伝子検査における
馬肉サンプル量についての統計学的解析

方法	サンプル量	標準偏差	相対標準偏差
実測	0.3 g	23927779	210.5 %
実測	10 g	1934402	44.7 %
乱数法	20 g	1710256	38.5 %
乱数法	30 g	1201308	26.7 %
乱数法	40 g	882867	21.1 %

表 5. エゾシカ中の住肉胞子虫検出率とシカの年齢との関連

年齢	検出	年齢	検出
0	6/7	5	7/7
1	6/6	6	1/1
2	2/2		
3	11/11	8	2/2
4	13/14		

陽性数／検体数

平成 26 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の安全性確保に関する研究

分担研究報告書

分担研究課題名 牛消化管内の大腸菌群等の分布状況

分担研究者：山崎 伸二 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

研究協力者：日根野谷淳 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

研究要旨：牛の肝臓内と胆汁を含む種々の消化管部位における大腸菌群細菌の分布及び陽性率と相関性を明らかにする目的で、牛の消化管内における大腸菌群の分布を調べた。その結果、唾液から牛の消化管内はほぼ 100%大腸菌群が検出され、細菌数は肛門に近づくに従い高くなった。一方、牛の肝臓内を 5 カ所に分けて同様に分布を調べた結果、非可食部位に相当する 3-5 での陽性率が約 52-57%と可食部に相当する 1 と 2 (26-34%) と比べた高かった。さらに、冬場に比べて夏場に高くなる傾向にあった。同様に *stx* 遺伝子を PCR で検出した結果、肛門の組織で 78.3%と最も高かったが、肝臓でも 3.3%の割合で検出されえた。しかし、*stx* 遺伝子陽性となった部位は全て非可食部位の 3-5 であった。

A. 研究目的

牛肝臓内から腸管出血性大腸菌 O157 が検出されたとの報告が切掛けで、生レバーの生食が禁止となった。一方、生レバーの需要は大きく、生レバーの復活が求められている。しかし、現状の牛肝臓を生で食すると腸管出血性大腸菌感染症に罹患する可能性が否定できず、特に小児や老人が感染すると溶血性尿毒症症候群や脳症を併発し重篤化する。

牛肝臓内に腸管出血性大腸菌が存在しているか、存在しているとどこに存在しているかを、牛肝臓内で腸管出血性大腸菌が陽性となる場合、他の消化管部位のどこに生息している可能性が高いかを明らかにすること目的とし、牛消化管内及

び肝臓内における大腸菌群細菌の分布を調べ、牛消化管内及び肝臓内における *stx* 遺伝子を検出し腸管出血性大腸菌の有無について検討した。

尚、牛の消化管の検体採取場所は、唾液、第一胃、十二指腸、盲腸及び直腸内容物又は組織、肝臓と胆汁で、大腸菌群の細菌数を調べた。さらに各消化管組織とその内容物について *stx* 遺伝子の検出を試みた。肝臓については可食部 1 と 2 に分け、非可食部については 3、4、5 に分けて大腸菌群の細菌数及び *stx* 遺伝子の検出を試みた。

B. 研究方法

1. 牛消化管組織内の大腸菌群細菌数の

測定と PCR 法による *stx* 遺伝子の検出

牛の屠畜解体直後に唾液 (n=41)、第一胃 (n=46)、十二指腸 (n=68)、盲腸 (n=69)、直腸 (n=65) のそれぞれの内容物と胆嚢 (n=65)、肝臓 (n=69) と胆汁 (n=69) を採取し直ちに研究室に持ち込み実験に供した。肝臓については約 50 g を同量の滅菌 PBS に加え、ストマッカー処理を 30 秒間行なった。処理が不十分な場合は、さらに 30 秒間処理を行なった。得られた懸濁液と原液の胆汁を直接滅菌 PBS で希釈し、マッコンキー寒天培地に植菌して、37°C で一夜培養し大腸菌群細菌数を測定した。さらに、ストマッカー処理した肝臓検体と胆汁検体をそれぞれ 1 mL を 1.25 倍の TSB 4 mL に加え 37°C、18 時間、浸透培養し、得られた増菌培養液 100 µL を 900 µL の TE buffer (pH 8.0) に加え、100°C、10 分間加熱し、その上清を鋳型 DNA として *stx* 遺伝子の検出するための PCR を行なった。

2. 肝臓内の大腸菌群細菌の分布と *stx* 遺伝子の PCR による検出

牛肝臓を図に示したように可食部に相当する部位 1 と 2、非可食部の 3、4、5 とに分け、1 と同様の方法で胆汁と共に大腸菌群細菌数の測定と PCR 法による *stx* 遺伝子の検出を試みた。

C. 研究結果

1-1. 牛消化管組織内容物の大腸菌群細菌数の測定

表 1 に示した通り、唾液から肛門にかけてほぼ 100% で大腸菌群細菌が検出さ

れた。データには示していないが、検出された細菌数も第一胃から肛門に近づくに従って高くなった。しかしながら、胆汁では 14%、肝臓では 68% で陽性となった。

1-2. 牛消化管組織内容物の *stx* 遺伝子の PCR 法による検出

表 2 に示した通り、*stx* 遺伝子は肛門組織で 78.3% と最も陽性率が高かった。しかしながら、肛門内容物では 45%、盲腸組織では 29%、盲腸内容物で 26%、十二指腸組織で 5.8%、十二指腸内容物で 15%、第一胃内容物で 8.6% であった。

一方、唾液で 22% とやや高めの値を示した。胆汁では調べた 149 検体全てで検出されなかったが、肝臓では 3.3% で陽性となった。

2-1. 肝臓内の大腸菌群細菌の分布

1-1 で肝臓から 68% の割合で大腸菌群細菌が検出されたため、肝臓を 5 つの部位に分けてどの部位で大腸菌群細菌が多く分付するかについて調べた。その結果、表 3 にまとめたように可食部に相当する部位 1 と 2 では、陽性率が 26 と 34% と低かったのに対し非可食部位の 3、4、5 ではそれぞれ 52、57、53% と高かった。さらに、季節性を考慮して比較すると、比較的気温の高い High シーズンでは、非可食部位の陽性率は 70% まで上がるのに対し、可食部位の陽性率は 20% 以下と低くなった。

2-2. 肝臓内の *stx* 遺伝子の分布

1-2 で肝臓から 3.3% の割合で *stx* 遺伝

子が検出されたため、2-1 とどうよう肝臓を5つの部位に分けてどの部位で *stx* 遺伝子が検出されるかについて調べた。その結果、可食部位に相当する 1 と 2 では全く検出されず、*stx* 遺伝子が検出されたのは、非可食部位の 3、4、5 であった。尚、現在得られた PCR 産物が *stx2* に特異的なものであるか確認中である。

D. 考察

当初、牛肝臓内で検出される腸管出血性大腸菌及び大腸菌群細菌は、胆汁に汚染している菌が胆管を通して肝臓内を汚染すると考えていた。しかし、今回得られた結果では、胆汁中の大腸菌群細菌と肝臓内で検出された大腸菌群細菌とは相関性が無く、単純にと畜解体後に胆汁中の菌が肝臓内を汚染しているのではない可能性が示された。*stx* 遺伝子についても同様に、今回調べた範囲で胆汁からは *stx* 遺伝子は全く検出されなかった。肝臓内で *stx* 遺伝子が検出された場合も、非可食部位に相当する 3、4、5 であった。一方、可食部位に相当する 1 と 2 では大腸菌群細菌が検出されたが、その割合は気温の高い夏場に多く、気温の低い冬場に少ない傾向にあった。しかし、*stx* 遺伝子は、夏場、冬場に関わらず検出されな

った。このことは、可食部位に STEC 存在する可能性は低く、何らかの方法で大腸菌群細菌のみならず腸内細菌科菌群を殺菌することができれば、生食用のレバーが提供できる可能性が考えられる。何故、非可食部位の 3、4、5 で *stx* 遺伝子が検出されたかは、今後の課題である。

E. 結論

牛肝臓内の大腸菌群汚染は、単純にと畜解体後の細菌汚染でなく、現在は不明であるが別の理由が考えられる。牛の肝臓内の大腸菌群細菌による汚染は、気温の高い夏場に多く、気温の低い冬場に少ない傾向にあった。さらに、通常生レバーとして提供される可食部位では検出される大腸菌群細菌数、陽性率も低く *stx* 遺伝子は検出されなかった。

F. 健康危機情報

無し

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願、登録状況

無し

表 1. 消化管内の大腸菌群細菌陽性率

	陽 性 数 / 検 体 数 (%)
唾液	41/41 (100)
第一胃内容物	46/46 (100)
十二指腸内容物	67/68 (98)
盲腸内容物	69/69 (100)
直腸内容物	65/65 (100)
胆汁	10/69 (14)
肝臓	47/69 (68)
胆嚢	14/65 (21)

表 2. 牛の消化管部位における *stx* 遺伝子の分布

採取部位 (検体数)	<i>stx1</i> 陽性数	<i>stx2</i> 陽性数	<i>stx1/2</i> 陽性数	合計 (%)
舌 (46)	1	1	1	(6,5)
唾液 (41)	1	3	5	6 (21.9)
胆汁 (149)	0	0	0	0 (0)
肝臓 (149)	0	5	0	5 (3.3)
第一胃内容物 (46)	2	1	1	4 (8.6)
十二指腸 (68)	1	2	1	4 (5.8)
十二指腸内容物 (68)	2	6	2	10 (14.7)
盲腸 (69)	4	14	2	20 (28.9)
盲腸内容物 (69)	4	12	2	18 (26)
肛門 (120)	7	61	26	94 (78.3)
肛門内容物 (65)	6	16	7	29 (44.6)

表 3. 季節ごとの肝臓部位別大腸菌群細菌陽性率

月/年	部位 1	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5	胆汁
<u>5/13-10/13</u>	<u>10/23 (43)</u>	<u>15/23 (65)</u>	<u>20/23 (87)</u>	<u>16/17 (94)</u>	<u>16/17 (94)</u>	<u>8/23 (35)</u>
11/13-5/14	7/33 (21)	8/33 (24)	16/33 (49)	17/33 (52)	15/33 (45)	4/33 (12)
<u>8/14-11/14</u>	<u>10/35 (29)</u>	<u>12/35 (34)</u>	<u>18/34 (53)</u>	<u>22/35 (63)</u>	<u>21/35 (60)</u>	<u>9/35 (26)</u>
11/14-2/15	1/17 (5.9)	2/17 (12)	2/17 (12)	3/17 (18)	2/17 (12)	1/14 (7.1)
<u>High (計)</u>	<u>20/58 (34)</u>	<u>27/58 (47)</u>	<u>38/57 (67)</u>	<u>38/52 (73)</u>	<u>37/52 (71)</u>	<u>17/58 (31)</u>
Low (計)	8/50 (16)	10/50 (20)	18/50 (36)	20/50 (40)	17/50 (34)	5/47 (11)
合計	28/108 (26)	37/108 (34)	56/107 (52)	58/102 (57)	54/102 (53)	22/75 (29)

下線はハイシーズン（陽性率の高い）夏場を示す

表 4. 肝臓の部位別 *stx* 遺伝子の検出率

部位	陽性数/検体数 (%)
1	0/145 (0)
2	0/149 (0)
3	2*/147 (1.4)
4	3*/135 (2.2)
5	2*/135 (1.5)

*1 検体、3箇所では *stx* 遺伝子が検出

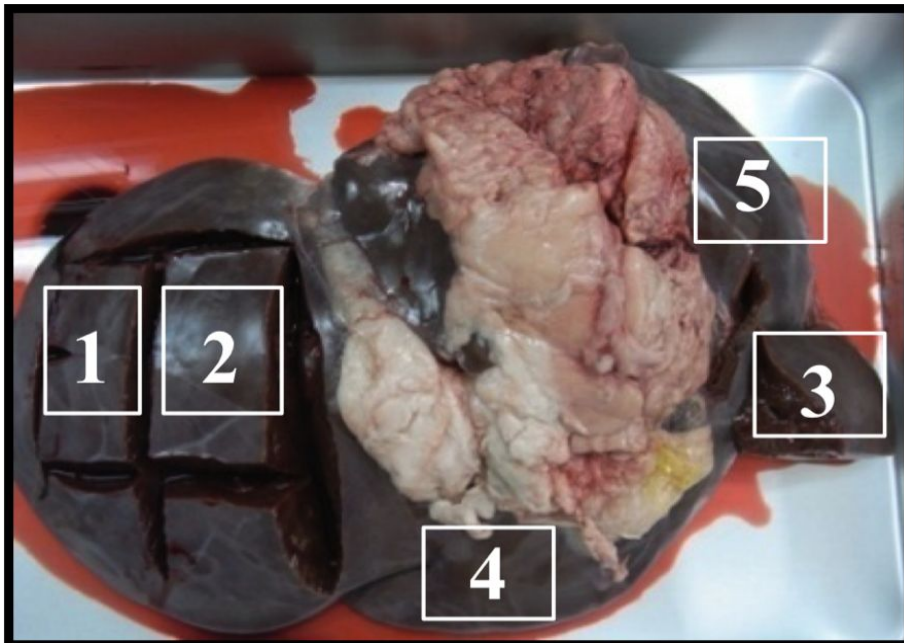


図. 肝臓から採取した部位 1-5 を示す

平成 25 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の安全性確保に関する研究 (H25-食品-一般-011)

分担研究報告書

分担課題名 放射線照射による微生物除去

研究分担者：等々力 節子 独) 農研機構 食品総合研究所

研究協力者：川崎 晋 独) 農研機構 食品総合研究所

研究協力者：都築和香子 独) 農研機構 食品総合研究所

研究要旨:牛肝臓内部に接種した *Campylobacter jejuni* 5096 株のガンマ線殺菌を行い、 D_{10} 値として、氷冷 (0°C) 脱気条件で 0.33kGy、凍結 (-80°C) 脱気条件で 0.69 kGy、を得た。凍結融解によって *C. jejuni* は 1 桁程度の死滅することと合わせると、*Salmonella* 属の殺菌を達成出来る条件で十分制御が可能になると判断された。脂質の放射線分解物である 2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)として、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB が、冷凍(0°C) 6 kGy、凍結(-80°C)10 kGy までの照射によって線量依存的に生成することを確認した。2-ACBs の生成量は包装条件の違いによる影響は少なく、前駆脂肪酸 1mmole から 1kGy の照射で生成する 2-ACBs の量は、これまでに牛肉で報告されている数 nmole より小さかった。また、照射によるトランス型脂肪酸の僅かな増加が認められたが、これも、包装条件による影響は少なかった。一方、脂質酸化の指標である TBA 値は、含気包装、 0°C での照射では増加が認められたが、脱気包装下や凍結下 (-80°C) の照射では、ほとんど変化が無かった。フランについては、冷蔵(0°C)、冷凍 (-80°C) の照射で、それぞれ 6kGy 、 10 kGy 照射をしても、検出されないことを確認した。

A. 研究目的

近年、食習慣の変化や高齢化などの社会状況の変化を反映し、わが国における細菌性あるいはウイルス性の食中毒の発生状況に変化が生じている。2011 年にはユッケを原因食材とする腸管出血性大腸菌による集団食中毒が発生し、それを契

機に畜産物の生食による食中毒リスクが議論された。特に、牛肝臓については、薬事・食品衛生審議会において、牛肝臓の内部が腸管出血性大腸菌により汚染される可能性があるとともに、それらを除去する手法が見いだせないことから、牛肝臓を生食用として販売することを禁止

する規格基準を設定された。この規制には解除の要望も多く、その決定の際には、今後、生食の安全性を確保する新たな知見が得られれば、必要な管理措置を改めて審議することも答申された。¹⁾。

そこで、放射線照射のような新たな微生物制御法についてもその有効性についての検討が必要となり、平成 24 年度より研究が開始された。

本分担当課題では、前研究課題を継続して、放射線照射による牛肝臓の殺菌条件を明らかにし、その際に生成する副産物及びその安全性を検討することを目的とする。

本年度は、牛肝臓中での *C. jejuni* について、殺菌に必要な線量の検討を行った。また、照射による副生成物について、冷凍 10 kGy、冷蔵 6 kGy までの線量で 2-アルキルシクロブタノン類の生成や脂肪酸のトランス異性体の生成量、TBA 値について定量的解析を行った。また、照射によるフランの生成の可能性についても検討した。

B. 研究方法

1. 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は、①つくば市内の精肉店より凍結状態の牛肝臓塊（約 1.0 kg）、もしくは②東京芝浦食肉処理場にて屠殺直後に凍結した牛肝臓塊（約 6.0 kg）を用いた。これらは購入後、-80℃で保存した。牛挽肉も①同様に、つくば市内の精肉店より購入し、実験に供した。試料は 25 g の塊となるよう無菌的に切り分け、各々ガスバリア性の袋に移した後、-80℃で冷凍保存した。

品質評価用の牛肝臓試料は、東京芝浦食肉処理場より、屠殺した翌日または翌々日に、冷蔵状態で入手した。肝臓は入手日のうちに 50g 程度の塊に切り分けて、ガスバリア袋（PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 180×250mm）にいれ、含気状態または脱気状態で包装した。包装後の試料は、冷蔵(0℃)照射では照射水中に 3 時間、凍結(-80℃)照射では超低温槽に一晩保管し、照射前の温度を恒温とした。

2. 供試菌株

供試菌は、研究機関および研究協力機関が所有する *C. jejuni* 5096 株を用いた。

供試菌は Brucella Broth(Difco)を用いて、微好気条件下で 41.5℃一昼夜静置培養した後、遠心分離（4000 g, 5 min）により菌体を収集、培地成分を除去した。菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、10⁹ CFU/mL となるように調整、これを供試菌液として以降の試験に用いた。

3. ガンマ線照射

ガンマ線照射はコバルト 60 線源を装填した Gamma Cell 220 (Nordion, Canada)を用いた。照射時の温度は、氷冷（0℃）および冷凍（ドライアイス下）（-80℃）の 2 条件を設定した。照射中の温度を一定に保つため、照射チャンバーと同形状の筒状型発泡スチロール箱を作成し、この中央に予冷した検体を入れ、周囲に氷（0℃）もしくはドライアイス（-80℃）を封入した。

吸収線量は試料に装着したアラニンペレット（ES200-2106：ブルッカーバイオ

スピン社製)の信号を ESR 装置 (Bruker EMX-Plus) で測定して決定した。検量線は英国の National Physical Laboratory の標準アラニンペレットで作成した。

4. 牛肝臓・挽肉のガンマ線殺菌試験

菌体の接種は、自然解凍後した 25g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液 100 μ L を注射針により注入することで行った。菌体濃度は終濃度で、 10^8 CFU/g 程度となるように調製した。菌体接種後の試料は、直ちに、ガスバリア袋 (PTS 袋, 三菱ガス化学製、PB180250P 90 $\times$ 120mm)を用いて含気あるいは真空包装を行った。含気条件では、ヘッドスペースに空気を残し、脱気条件では、真空包装機を用いて、袋内の空気を抜いてヒートシールした。包装後の検体は、氷中もしくは -80°C の冷凍庫内で2時間以上放置して温度を一定にした後、冷蔵では0 $\sim$ 1.2 kGy、冷凍では0 $\sim$ 3.0 kGy の範囲の線量を照射した。照射後の検体は直ちに、もしくは解凍後直ちに菌数計測した。

5. 生菌数測定

ガンマ線照射後の検体は、滅菌緩衝ペプトン水 (BPW: Difco)を加えて10倍乳剤とし、必要に応じてその10倍段階希釈試料液を調製した。各10倍段階希釈試料液は、標準寒天平板 (Merck) および mCCDA 平板 (Oxoid) にスパイラルプレーティング法で塗抹した。標準寒天平板は好気条件で 35°C 、mCCDA 平板は 41.5°C で各々48時間培養し、その出現集落数から1g当たりの一般生菌数ならびに *C. jejuni* の数を求めた。mCCDA 平板

上の集落については、平板あたり5つの集落を選択し、これらをイムノクロマト法による *Campylobacter* 同定キット (Singlepath *Campylobacter*; Merck) に供し、典型集落が *Campylobacter* 属であることを確認した。

6. TBA 価の測定

TBA (チオバルビツール酸) 価の測定は、衣巻らの方法²⁾に従い、水蒸気蒸留法により、(一財)日本食品分析センターに委託して実施した。

7. 牛肝臓の脂肪酸分析

照射および非照射の牛肝臓 (約 50g) から、約 3g の肝臓を秤量し、メタノール 50mL を加えてホモジナイザー (AM-8 型, Nissei) で2分間攪拌後、抽出液をろ過した。さらに残渣を 50 mL のクロロホルム/メタノール (2:1) (C/M) 溶液で2回抽出し、最後に 20mL の C/M 溶液で洗浄した。集めた抽出液に 0.88% KCl 溶液 93 mL を加えて分液ロト中で混和し、1晩放置後、クロロホルム層を集め、硫酸ナトリウムで脱水した後に濃縮し、Hexane/2-prpopanol(3:2)溶液で 20mL に定容した。

脂質溶液から 25mg 分の脂質を秤取り、2mg のトリデカン酸を内部標準として添加し、3 フッ化ホウ素メタノール試薬 (和光純薬 (株)) により脂肪酸をメチルエステル化し、GC で分析した。³⁾

<GC 条件>

装置: Shimadzu GC-2010

カラム: SP-2560 (100m×0.25mm×0.2μm, SUPELCO Inc.)

カラム温度: 175 °C (60min)→1 °C /min→215°C

注入口温度: 250°C

検出器温度: 250°C

注入量: 1μL

スプリット比: 1/100

キャリアガス流量: 1mL/min

8. 2-アルキルシクロブタノン分析

牛肝臓 5g を秤量し、硫酸ナトリウム 20g を加え乳鉢中で均一に混和し、氷上で 30 分放置した。これをステンレス製遠心チューブに移し、40mL のヘキサンを加え、高速ホモジナイザー(ヒスコトロン NS-52 型, マイクロテック社製)で 1 分間攪拌後、10,000 x g で 10 分間遠心し、ヘキサン画分を集めた。この抽出操作をもう一度繰り返し、集めたヘキサン溶液に硫酸ナトリウムを加えて脱水した。ヘキサン抽出液の溶媒を留去後、抽出物をアセトン 2mL に再溶解し、さらにアセトニトリル 2mL を加えて-20°Cで 30 分以上冷却して脂肪分を析出させた。これを 0°C、1,680 x g で 10 分間遠心して取り除き、2-アルキルシクロブタノン類 (2-ACBs)が含まれる上清を濃縮して、2mL のヘキサンに再溶解した。この溶液を 1mL ずつ、ガラス製の 1g のシリカゲルカラム (Merck Shilica gel 60 70-230 mesh) 2 本に添加し、10mL のヘキサンで洗浄後、ヘキサン/ジエチルエーテル (98:2) 15mL で溶出し、その 5-15mL 画分を集めた。⁴⁾ この試料を濃縮して GC-MS で分析し、2-ドデシルシクロブタ

ノン (2-dDCB) および 2-テトラデシルシクロブタノン(2-tDCB)、2-テトラデセニルシクロブタノン(2-tDeCB)を定量した。

<GC-MS 条件>

GC 装置: GC: GC-2101,

検出器: MS: QP2010+ Shimadzu 200°C

カラム: DB-5MS(60m × 0.25mm 0.25μm)

カラム温度: 55°C(2min)→20°C/min→175°C, 2°C/min→250°C, 10°C/min→270°C(20min)

注入口 250°C

注入モード: パルスドスプリットレス

注入サンプル量 1μL

モード: EI (70eV) SIM 測定

定量イオン: m/z=98

確認イオン m/z=112

9. フランの分析

牛肝臓は、左葉部分を約 100g の塊に切り分け、ガスバリア袋 (PTS 袋, 三菱ガス化学製、PB180250P 180×250mm) にいれ、含気状態のままヒートシールし、予冷の後、3 kGy (0°C)、または 10kGy (-80°C) を照射した。照射後の試料は分析に供するまで、-80°Cで凍結保管した。

フランの分析は、Yoshida⁵⁾ らの方法により、(一財)日本食品分析センターに委託して実施した。ポリエチレンバックに含気状態で包装した牛肝臓 (50g 程度) を、氷冷状態(0°C)で 6kGy、ドライアイス下 (-80°C) で 10kGy の 2 条件でガンマ線照射し、照射後の試料は-80°Cで保管した。分析時には、未開封の状態の試料を冷蔵庫(約 4°C)中に移して解凍し、冷蔵

庫から取り出した後、速やかに塩化ナトリウム 4 g を入れた 20 ml ヘッドスペースバイアルに 1 g 採取した。このバイアルに、あらかじめ氷冷した精製水を 10 ml 加えた後直ちに密栓し、d4-フラン 50 ng(内標準物質)を添加し試験溶液とした。バイアル中のヘッドスペースガスを、ヘッドスペースサンプラーによりガスクロマトグラフ-質量分析計に注入し、得られたピーク高比から、予め作成した検量線を用いて試料中のフラン濃度を求めた。GC-MS の操作条件は以下による。

<ヘッドスペースサンプラー操作条件>

機種：7694 (Agilent Technologies, Inc.)

オープン温度：60°C

バイアル加熱時間：30 min

ループ温度：100°C

トランスファーライン温度：130°C

加圧時間：0.3 min

<GC-MS 操作条件>

機種：6890N/5973N

カラム：DB-WAX

φ0.25 mm×60 m, 膜厚 0.25 μm

導入系：スプリット(1:40)

温度：試料注入口 200°C, カラム 40°C

ガス流量：He 1 ml/min

イオン源温度：230°C

イオン化電圧：70 eV

イオン化法：EI

設定質量数：フラン m/z 68, 39

d4-フラン m/z 72

C. 研究結果および考察

1. 牛肝臓中の *C. jejuni* の殺菌効果

過去研究事例から、*Campylobacter* 属

はガンマ線に対する抵抗性は低いことが示唆されてきた。牛肝臓および牛挽肉中において *C. jejuni* を接種し、ガンマ線照射を行った際の殺菌効果を表 1 に示した。

過去の研究事例報告からも示唆された通り、*C. jejuni* の D_{10} 値は大腸菌株よりも低い結果を得た。Rocelle ら⁶⁾によれば、低脂肪の牛挽肉条件下で本菌の冷蔵下 (3~5°C) および凍結 (-17~-15°C) でガンマ線を照射した場合、その D_{10} 値は 0.175、0.235 と報告されており、本研究ではそれと比較して若干高めに観察された。これは本研究で用いた供試菌の抵抗性が高いというよりも、現在の *Campylobacter* 検出培地の高性能化および微好気培養条件の発達により検出率が改善したためと予想された。しかしながら過去の牛挽肉での研究事例にもあるように、大腸菌 O157 株よりも本菌の抵抗性は低く、牛肝臓においてはガンマ線抵抗性の試験指標菌として詳細に検討する必要はないと現時点では考えられた。

加えて-80°Cで凍結した検体では、凍結および解凍の時点で本菌の菌数が 1 ケタ低下し、これは牛肝臓・挽肉共に観察された。すなわち、*Campylobacter* 属については凍結融解ストレスによる死滅も加えて考慮でき、適切に凍結融解がなされるのであれば、表 1 に述べた D_{10} 値の効果に加えての死滅効果が期待されると考えられた。

4. ガンマ線照射による牛肝臓脂質の変化

4.1 TBA 価 および脂肪酸含量

表 2 に包装条件と温度を変えてガンマ線照射した肝臓の TBA 価とトランス及

びシス体の不飽和脂肪酸含量をまとめた。また、表 3 に主要な脂肪酸の含量をまとめた。

一般的に脂質の過酸化と相関があるとされる TBA 価は、0°C、含気状態の照射で線量に応じて増加したが、0°C、脱気包装の照射では、統計的に有意な増加は見られなかった。また、-80°C凍結状態の照射でも、TBA 価は非照射のコントロールに比べてやや増加する傾向はみられ、含気包装では 10 kGy の照射で、統計的に有意な増加がみられたがその変化量は非常に小さく、また、脱気包装では、10kGy の照射でも有意な増加は検出されなかった。

今回の試験で用いた牛肝臓は、主な構成脂肪酸として、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1-9c)、パルミチン酸(16:0)、リノール酸(18:2-9c,12c)、アラキドン酸(20:4)などが含まれていた。また、含有量は少ないが、不飽和脂肪酸では、バクセン酸(18:1-11t)のほか 18:1,18:2 などの C18 のトランス異性体の他、C14~C17 のトランス型のモノエン酸も非照射及び照射のいずれの検体にも含まれていた。

ガンマ線照射によって、いずれの照射条件の試料でもトランス異性体がわずかに増加した。特に 0°Cの照射では線量に応じた増加が顕著で、6 kGy の照射では 18:1 および 18:2 のトランス酸の総量や炭素数 18 のトランス酸の総量、より短鎖のトランス酸も加えた総トランス脂肪酸量について、非照射試料と比較して統計的な有意差が認められた。凍結下の照射でも 10kGy では統計的に有意なトランス酸の増加が認められた。含気包装と脱気包装の同一温度、同一線量でのトランス異

性体の量は統計的には有意な差は認められず、TBA 価の場合と異なり、包装条件による影響はほとんど認められなかった。

これまでの研究の成果から、微生物の殺滅に必要なガンマ線の量は、冷蔵 6 kGy 、凍結(-80°C)で 10 kGy を超えることは無いと見通せる。トランス異性化については、牛肝臓の脂質含量が 5%未満であることも考慮すると、今回の研究の範囲の最大変化量でも、国際機関の推奨するトランス脂肪酸摂取量（総摂取エネルギーの 1%未満⁷⁾、1800kcal 摂取する人のトランス脂肪酸摂取推奨量は 2g 未満）を考慮すると、照射による牛肝臓のトランス脂肪酸量の増加は、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えないと考えられる。

また Li らは、常温(20°C)での牛挽肉のガンマ線照射において、6.74kGy 以上の照射でアラキドン酸(20:4)等の多価不飽和脂肪酸の含量の有意な低下を報告しているが⁸⁾、表 2、3 の結果から、今回の照射条件の範囲内では、飽和脂肪酸の割合の増加や、多価不飽和脂肪酸の減少は認められなかった。

4.2 2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)の生成

2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)は照射より特異的に生成する脂質の放射線分解物^{9),10)}であるとして、照射食品の検知の指標物質として利用されている。^{11),12)} この化合物の照射食品中の安全性に関しては多くの議論もあるが、その含量が微量であること、エームス試験等の変異原性試験が陰性であるこ

と等を理由に、ヨーロッパ食品安全機関（EFSA）では、照射食品摂取の際の健康影響は無視できると結論している。¹³⁾ また、最近、Yamakage らは 2-ドデシルシクロブタノン（2-dDCB）および 2-テトラデシルシクロブタノン（2-tDCB）の遺伝毒性を否定した論文を公表し¹⁴⁾、Sato らも、2-tDCB の発がんプロモーション活性を検出出来なかったとの報告¹⁵⁾している。ただし、わが国では、照射食品の安全性に関する評価が定まっていないことから、照射により生成する可能性のある 2-ACBs を定量的に把握する必要があると考えた。

分析方法の精度確認として、分析に用いた肝臓と同ロットの試料に標準試薬をスパイクして添加回収率を求めた。この試験は、実試料の分析期間の最初と最後及び中間の期間の 3 日に分けて 3 併行で実施した。低濃度添加として、2-dDCB および 2-tDCB を 2 ng/g FW、2-テトラデセニルシクロブタノン（2-tDeCB）を 5 ng/g FW で、スパイクして行った際の回収率は、 64.7 ± 10.3 , 68.3 ± 9.8 および $62.7 \pm 9.8\%$ (n=9)であった。また、高濃度添加として 2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB を 20 ng/g FW, 20 ng/g FW, 51 ng/g FW で添加した際の回収率は 59.6 ± 4.1 , 59.9 ± 4.3 および $61.8 \pm 5.1\%$ (n=9) であった。

表 4 に、3 種の異なる温度包装条件で照射した際の 2-ACBs の定量結果を示す。非照射のコントロール試料からはいずれの 2-ACBs も検出されなかった。また、同一の温度と包装条件下の照射では、線量にほぼ比例して、3 種の 2-ACBs が検出

された。そこで、同一条件での分析値を線量に対して直線回帰した傾きから、1 kGy あたりに換算した 2-ACBs の生成量を求めて表 5 にまとめた。この際の相関係数は、0.87~0.97 であった。

肝臓生重量・1 kGy あたりの 2-dDCB および 2-tDCB の生成量は、2-tDCB の含量が 2-dDCB の含量に比べて大きく、-80℃に比べて 0℃の照射の方がやや大きな値となった。一方、オレイン酸を前駆体とする 2-tDeCB は、-80℃ 照射における生成量が 0℃ 照射の場合に比べて著しく大きくなった。なお、包装条件により同一温度内での 2-ACBs 生成量には若干の差がみられるものの、分析値の変動を考慮すると有意な差としては検出されないと考えられた。

Ndiaye らは 6-8℃で照射牛肉中の 2-dDCB および 2-tDCB の生成効率として、1.0 および 1.0 nmole/mmmole FA/kGy を報告している¹⁰⁾。また、Marchioni らは、6-8℃で照射した牛肉の、2-dDCB, 2-tDCB、2-tDeCB の生成効率を、1.33, 1.59、1.67 nmol/mmmole/kGy と報告している。¹⁵⁾ 今回の肝臓の分析結果は、回収率を 60%程度と見込んでも、これらの報告値に比べて、生成効率はやや低めであった。この理由としては、照射温度の違いが大きく影響していることが予測される。いずれにせよ、今回の実験で用いた条件下の牛肝臓の 1 kGy の照射で、多くの畜肉類で報告されている前駆脂肪酸 1mmole あたり 1~2 nmole という生成効率を大きく超えるようなことは無いと判断された。

以上より、牛肝臓の脂質含量が牛挽肉等の畜肉に比べて低いことを考慮すると、殺菌に必要な線量が牛挽肉に比べて大きくなったとしても、すでに米国等で許可されている牛挽肉に比べて多量の 2-ACBs が照射牛肝臓中に生成することは無いものと予測された。

5. フラン生成の可能性の確認

今回採用した分析条件において、繰り返し測定標準偏差に基づいて求めた、フランの定量下限値 (LOQ) および検出限界値 (LOD) はそれぞれ 2 ng/g FW および 0.5 ng/g FW であった。⁵⁾ 牛肝臓を分析した結果、照射 (6 kGy 0°C, 10 kGy -80°C) および未照射試料のいずれにおいても、定量下限を超える濃度のフランは検出されなかった。

D. 結論

牛肝臓内部に接種した *C. jejuni* 5096 株の D₁₀ 値は、氷冷 (0°C) 脱気条件で 0.33 kGy、凍結 (-80°C) 脱気条件で 0.69 kGy であった。また、非照射試料を凍結し融解する操作で約 1 桁の菌数低減があった。これらの結果を前年までの結果と合わせると、ガンマ線殺菌の効果を判定する指標菌としては、その放射線感受性の点から *Salmonella* を選択することが適切と判断された。

冷蔵 6 kGy、冷凍 10 kGy までの照射で、不飽和脂肪酸の有意な減少はなかったが、照射によるトランス異性化が認められ、トランス酸含量は僅かに増加した。含気包装と脱気包装の違いによる影響は少なかった。脂質の放射線分解物である 2-アルキルシクロブタノン類として、

2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB の照射による線量依存的な生成を確認した。生成量は包装条件の違いによる影響は少なく、前駆脂肪酸 1 mmole から 1 kGy の照射で生成する 2-ACBs のこれまでに牛肉で報告されている効率と同程度かそれ以下であった。

フランについては、冷蔵 (0°C)、冷凍 (-80°C) の含気条件かで、殺菌効果を得るより十分大きな線量である 6 kGy、10 kGy で照射をしても、定量下限を超える濃度のフランは検出されないことを確認した。

E. 文献

- 1) 厚生労働省、薬事・食品衛生審議会、食品衛生分科会 2012 年 6 月 12 日, <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002fsbi.html>
- 2) 柴田, 衣巻, 水産食品油脂の TBA 測定法の検討, 日水誌 45(4) 499-503 (1979).
- 3) 日本油化学会編, 基準油脂分析試験法 (2013 年度版) 2.4.4.3-2013 トランス脂肪酸含量 (キャピラリークロマトグラフ法)
- 4) Kitagawa, Y., *et al.*, A Rapid and Simple Method for the Determination of 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Meat and Processed Foods. *Food Analytical Methods in press*. DOI 10.1007/s12161-013-9714-5
- 5) Yoshida, I. *et al.*, Rapid and Improved Determination of Furan in Baby Foods and Infant Formulas by

- Headspace GC/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 48(4). 48, 83-89 (2007)
- 6) Rocelle, M. et al, Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonellae*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation, *Appl. Env. Microbiol.* 60, 2069-2075, (1994)
- 7) WHO, Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO Technical Report Series (No.916), 2003.
WHO(2003) 食事、栄養、慢性疾患予防に関する WHO/FAO 合同専門家会合報告書)
http://www.who.int/nutrition/topics/dietnutrition_and_chronicdiseases/en/
- 8) A. Li et al., Formation of trans fatty acids induced by radicals in irradiated ground beef and liquid egg. *J Am.Oil Chem*, 89, 2207-2213(2012).
- 9) Elvis M. K. et al., Analysis of 2-Alkylcyclobutanones in Cashew Nut, Nutmeg, Apricot Kernel, and Pine Nut Samples: Re-evaluating the Uniqueness of 2-Alkylcyclobutanones for Irradiated Food Identification *J. Agric. Food Chem.*, 61 (41), 9950–9954 (2013).
- 10) Ndiaye, B. et al, 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs II. The CEN method: field of application and limit of utilization., *Radiation Physics and Chemistry* 55437-445 (1999).
- 11) EN1784, Foodstuffs - Detection of irradiated food containing fat -. Gas chromatographic analysis of hydrocarbons (2003)
- 12) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長, 放射線照射された食品の検知法について (食安発第 0706001 号、平成 19 年 7 月 6 日、最終改正平成 24 年 9 月 10 日)
- 13) EFSA, Statement summarising the Conclusions and Recommendations from the Opinions on the Safety of Irradiation of Food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels, *EFSA Journal* 9(4): 2107 (2011).
- 14) Yamakage, et al, Genotoxic potential and in-vitro tumour-promoting potential of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone, two radiolytic products of fatty acids. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 770, 95-104 (2014).
- 15) Sato, M. et al, Toxicities and Modifications on Azoxymethane-induced Carcinogenesis of 2-Tetradecylcyclobutanone as a Radiolytic Product of Stearic Acid in F344 Rats, *J. Toxicologic Pathology* in press
- 16) Marchioni, E. et al, Production Yields of 2-alkylcyclobutanones in irradiated foods. Proceedings of International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2009.
<http://www.iaea.org/inis/collection/NCL>

[CollectionStore/ Public/41/072/4107262
8.pdf](#)

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表
総説等

1. 等々力節子, 川崎晋, 放射線殺菌,
食品衛生学雑誌、55(6)J215-218(2014)
学会発表
なし

講演・研修会等

1. 等々力節子, 放射線殺菌, 第 107 回
日本食品衛生学会学術講演会シンポジ
ウム H26. 5.16

H. 知的財産権の出願, 登録状況
なし

表 1. 牛挽肉・肝臓に接種した *C. jejuni* 1221 株のガンマ線照射による殺菌効果

照射条件	D ₁₀ 値 (kGy)			
	氷 冷		ドライアイス	
	含気	脱気	含気	脱気
挽肉	0.21	0.29	0.46	0.46
牛肝臓	0.26	0.33	0.58	0.69

表 2. 牛肝臓のシス／トランス型脂肪酸含量と TBA 価

脂肪酸 (g/100g lipid)	非照射	氷冷 (0℃) 照射			凍結(ドライアイス下 -80℃) 照射				
		脱気包装 (-O2)		含気包装 (+O2)	脱気包装 (-O2)		含気包装 (+O2)		
		3 kGy	6 kGy	3 kGy	6 kGy	5 kGy	10 kGy	5 kGy	10 kGy
Control									
総飽和脂肪酸	26.9 ± 0.7	26.6 ± 1.0	26.6 ± 1.1	26.4 ± 1.5	26.7 ± 0.2	27.3 ± 0.2	27.4 ± 0.3	27.7 ± 0.7	27.3 ± 0.3
シス型モノエン酸	14.3 ± 0.4	14.2 ± 0.5	14.1 ± 0.6	14.1 ± 0.8	14.0 ± 0.2	14.7 ± 0.1	14.7 ± 0.2	14.9 ± 0.4	14.5 ± 0.2
シス型ポリ塩酸	21.9 ± 0.7	21.4 ± 0.8	21.1 ± 0.9	21.4 ± 1.1	21.3 ± 0.3	22.1 ± 0.2	22.1 ± 0.3	22.4 ± 0.6	21.9 ± 0.2
総シス型不飽和脂肪酸	36.2 ± 1.0	35.5 ± 1.3	35.3 ± 1.5	35.4 ± 1.9	35.3 ± 0.5	36.8 ± 0.3	36.8 ± 0.5	37.2 ± 1.0	36.5 ± 0.4
トランス型モノエン酸	2.05 ± 0.11	2.07 ± 0.07	2.17 ± 0.11	2.05 ± 0.12	2.10 ± 0.07	2.10 ± 0.01	2.20 ± 0.04 *	2.15 ± 0.05	2.13 ± 0.07
トランス型ポリエン酸	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.03 *	0.34 ± 0.02 **	0.20 ± 0.02 **	0.32 ± 0.02 **	0.16 ± 0.04	0.22 ± 0.03 *	0.20 ± 0.02 **	0.20 ± 0.01 **
総トランス型不飽和脂肪酸	2.18 ± 0.12	2.29 ± 0.07	2.51 ± 0.10 **	2.25 ± 0.14	2.42 ± 0.08 *	2.27 ± 0.04	2.42 ± 0.07 **	2.35 ± 0.07 *	2.32 ± 0.08 *
トランス 18:1	0.92 ± 0.07	0.96 ± 0.02	1.06 ± 0.04 **	0.95 ± 0.09	1.02 ± 0.02 *	0.96 ± 0.01	1.04 ± 0.03 **	0.98 ± 0.01	0.98 ± 0.04
トランス 18:2	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.03 *	0.34 ± 0.02 **	0.20 ± 0.02 **	0.32 ± 0.02 **	0.16 ± 0.04	0.22 ± 0.03 *	0.20 ± 0.02 **	0.20 ± 0.01 **
トランス 18:3	ND	ND	ND	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
C18 総トランス型不飽和脂肪酸	1.04 ± 0.08	1.18 ± 0.02 **	1.40 ± 0.03 **	1.15 ± 0.10	1.33 ± 0.03 **	1.12 ± 0.04	1.26 ± 0.05 **	1.18 ± 0.02 **	1.18 ± 0.05 *
TBA 値 (nmole/g FW)	1.55 ± 0.14	2.17 ± 0.36	1.84 ± 0.24	3.34 ± 0.05 **	6.68 ± 0.46 **	1.73 ± 0.19	1.76 ± 0.16	2.09 ± 0.17 *	1.93 ± 0.12 *

mean values ± SD (n=3)

Statistically significance were determined by t test compared with the control values (*; p < 0.05, **; p < 0.01)

表 3. 牛肝臓の主要脂肪酸含量

		氷冷 (0°C) 照射						凍結(ドライアイス下, -80°C) 照射					
		脱気包装 (-O2)			含気包装 (+O2)			脱気包装 (-O2)			含気包装 (+O2)		
		3 kGy	6 kGy	3 kGy	6 kGy	3 kGy	6 kGy	5 kGy	10 kGy	5 kGy	10 kGy	5 kGy	10 kGy
非照射													
Control													
14:0	0.25 ± 0.09	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.00	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01
15:0	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.42 ± 0.01
16:0	8.32 ± 0.24	8.28 ± 0.28	8.28 ± 0.35	8.22 ± 0.47	8.21 ± 0.08	8.22 ± 0.47	8.21 ± 0.08	8.48 ± 0.10	8.51 ± 0.11	8.57 ± 0.23	8.21 ± 0.08	8.57 ± 0.23	8.21 ± 0.08
16:1 9c	0.61 ± 0.03	0.62 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.59 ± 0.01	0.60 ± 0.02	0.59 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.59 ± 0.01
17:0	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.002	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.002	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.003	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.002	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.002
16:1 13c	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.002	0.16 ± 0.004	0.15 ± 0.002	0.16 ± 0.004	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.004	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.004	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.004
17:1 9c	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.003	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.00	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.00	0.20 ± 0.01
18:0	16.7 ± 0.5	16.5 ± 0.6	16.4 ± 0.7	16.4 ± 0.9	16.6 ± 0.2	16.4 ± 0.9	16.6 ± 0.2	16.9 ± 0.1	17.0 ± 0.2	17.1 ± 0.4	16.6 ± 0.2	17.1 ± 0.4	16.6 ± 0.2
18:1 11t	0.48 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.50 ± 0.02	0.47 ± 0.04	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.04	0.48 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.48 ± 0.01
18:1 9c	11.7 ± 0.3	11.6 ± 0.4	11.6 ± 0.5	11.5 ± 0.6	11.5 ± 0.2	11.5 ± 0.6	11.5 ± 0.2	12.0 ± 0.1	12.0 ± 0.1	12.2 ± 0.3	11.5 ± 0.2	12.2 ± 0.3	11.5 ± 0.2
18:1 11c	1.11 ± 0.05	1.08 ± 0.06	1.06 ± 0.04	1.07 ± 0.10	1.06 ± 0.04	1.07 ± 0.10	1.06 ± 0.04	1.12 ± 0.01	1.12 ± 0.01	1.12 ± 0.03	1.06 ± 0.04	1.12 ± 0.03	1.06 ± 0.04
18:2 9c 12c	11.4 ± 0.4	11.2 ± 0.4	11.0 ± 0.4	11.1 ± 0.6	11.1 ± 0.1	11.1 ± 0.6	11.1 ± 0.1	11.5 ± 0.1	11.6 ± 0.1	11.6 ± 0.3	11.1 ± 0.1	11.6 ± 0.3	11.1 ± 0.1
18:3	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.01
21:0	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.29 ± 0.01
20:3	2.27 ± 0.06	2.17 ± 0.08	2.19 ± 0.08	2.20 ± 0.13	2.20 ± 0.03	2.20 ± 0.13	2.20 ± 0.03	2.27 ± 0.02	2.28 ± 0.03	2.31 ± 0.07	2.20 ± 0.03	2.31 ± 0.07	2.20 ± 0.03
20:4	5.10 ± 0.15	4.95 ± 0.17	4.92 ± 0.22	4.95 ± 0.28	4.99 ± 0.06	4.95 ± 0.28	4.99 ± 0.06	5.08 ± 0.05	5.10 ± 0.09	5.17 ± 0.16	4.99 ± 0.06	5.17 ± 0.16	4.99 ± 0.06
20:5	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.001	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.01
22:4	1.22 ± 0.03	1.18 ± 0.06	1.16 ± 0.04	1.18 ± 0.06	1.18 ± 0.02 *	1.18 ± 0.06	1.18 ± 0.02 *	1.23 ± 0.02	1.23 ± 0.02	1.25 ± 0.04	1.18 ± 0.02	1.25 ± 0.04	1.18 ± 0.02
22:5	0.99 ± 0.03	0.95 ± 0.03	0.94 ± 0.04	0.96 ± 0.05	0.95 ± 0.02	0.96 ± 0.05	0.95 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.98 ± 0.01	1.01 ± 0.04	0.95 ± 0.02	1.01 ± 0.04	0.95 ± 0.02
22:6	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.005 *	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.004	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.01

mean values ± SD (n=3)

Statistically significance were determined by t test compared with the control values (*; p < 0.05, **; p < 0.01)

表 4. ガンマ線照射した牛肝臓中の 2-アルキルシクロブタノン含量

処理	dDCB (ng/g FW)	tDeCB (ng/g FW)	tDCB (ng/g FW)
脱気包装 (- O ₂) 0 °C			
3 kGy	4.04 ± 0.26	4.63 ± 0.72	8.43 ± 0.12
6 kGy	7.89 ± 0.36	9.40 ± 1.09	17.5 ± 1.80
含気包装 (+O ₂) 0 °C			
3 kGy	3.31 ± 0.07	4.04 ± 0.14	7.66 ± 0.21
6 kGy	6.97 ± 0.57	8.43 ± 1.40	15.8 ± 1.67
	-	-	-
脱気包装 (- O ₂) -80 °C			
5 kGy	4.72 ± 0.33	17.2 ± 1.1	12.1 ± 1.4
10 kGy	10.9 ± 0.8	34.7 ± 2.1	28.7 ± 1.8
	-	-	-
含気包装 (+ O ₂) -80 °C			
5 kGy	4.01 ± 0.34	18.9 ± 1.1	11.3 ± 1.4
10 kGy	9.47 ± 0.94	37.1 ± 3.3	25.7 ± 2.1
Mean ± SD (n = 3)			

表 5 2-ACBs の生成効率

(1kGy あたりの生成量)		ng / g FW / kGy		
		2-dDCB	2-tDeCB	2-tDCB
照射条件				
冷蔵	0℃ 脱気包装	1.3	1.6	2.9
冷蔵	0℃ 含気包装	1.2	1.4	2.6
凍結	-80 ℃ 脱気包装	1.0	3.5	2.8
凍結	-80 ℃ 含気包装	0.92	3.7	2.5

kGy	(先駆脂肪酸 1mmol、1kGy あたりの生成量)		nmole / mmole FA/		
			2-dDCB	2-tDeCB	2-tDCB
	照射条件				
	冷蔵	0℃ 脱気包装	0.33	0.26	0.37
	冷蔵	0℃ 含気包装	0.29	0.23	0.33
	凍結	-80 ℃ 脱気包装	0.27	0.57	0.35
	凍結	-80 ℃ 含気包装	0.23	0.61	0.32

平成 26 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業

畜産食品の安全性確保に関する研究

分担研究報告書

高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する検討

分担研究者	荻原 博和	日本大学生物資源科学部
研究協力者	阿部 申	日本大学生物資源科学部
研究協力者	岡田 由美子	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：牛の肝臓は病原菌に汚染している可能性が高く、生食するためにはこれらの病原菌の除去や殺菌が必要とされている。そのため生食を可能にするためには、これらの病原菌の除菌や殺菌を行い、肝臓の生の食感を残しつつ、感染リスクの低減をはかる必要がある。

牛の肝臓における病原菌からの感染リスクを減少するために、現在の技術では非加熱殺菌処理技術が有望とされている。初年度はこれらの技術の中から高圧処理技術（静水圧）を利用することで牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化について検討した。その結果、高圧処理 400 及び 500MPa の圧力は、有効に *E.coli* を不活化させる効果を確認できたが、牛肝臓が特殊な色合いと食感を持つことから、これらの高圧処理を行うと本来がもっている生のレバーの食感が損失することが明らかとなった。

そこで本年度は、400 及び 500Mpa の高い静水圧ではなく、比較的低い圧力 250MPa に注目し処理時間を延長することで、低圧力で肝臓中の病原菌を不活化させる効果について検討を行った。

A. 研究目的

食肉の中でも肝臓は病原菌に汚染している可能性が高く、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、E 型肝炎ウィルス等が検出されている。食肉に関連した食中毒事例も毎年報告されており、これらの事例においてはごく少量でも感染する腸管出血性大腸菌やカンピロバクターなどによるものが多くを占めている。したがって、これらの食中毒を防止するためには十分な加熱による調理と取り扱いの衛生管理が重要であることが知られている。しかし、加熱処理は病原菌の殺菌には非常に有効であるが、その食材は熱により変性することが知られている。肝臓等を生食するためには、これらの病原菌の殺菌や除菌処理が必要となる。そのため生の食感をできるだ

け残しつつ、これらの病原菌の殺菌を行い、病原菌による感染リスクの低減を図る処理技術が必要である。

加熱処理を伴わない有効な殺菌技術としては、放射線、高電圧パルス、パルス光、高圧殺菌等の非加熱殺菌技術が存在している。なかでも静水圧を利用した高圧処理は、非加熱のため加熱による熱変性がなく、生の食材の香り、色、風味が保持されることが特徴である。さらに高圧処理により微生物も不活化するメリットもあることから病原菌のリスク低減に有効と考えられている。

本分担研究では、前年度より「高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する研究」を進めており、非加熱処理技術の高圧処理により細菌の不活化データの構築を進めている。昨年度

は高圧処理による検討では、400MPa 及び 500MPa の圧力が、*E. coli* の不活化に有効なデータを得ることができたが、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。

そこで本年度は、静水圧の圧力が高い 400 及び 500MPa ではなく、比較的低い圧力の 150～250MPa による食品媒介病原細菌の不活化の検討を行った。さらに肝臓中に接種した *E. coli* の不活化効果とその高圧処理が肝臓の肉色と肉質に及ぼす影響について検討を行った。

B. 研究方法

1. 高圧処理の 250MPa と圧力時間が *Escherichia coli* と *Salmonella Typhimurium* に及ぼす死滅効果

(1) 供試菌株

実験に供した菌株は代表的な *E. coli* ATCC 25922 と *S. Typhimurium* IID 1000 を用いた。なお、-80℃に保存してある菌株を取り出し、TSB 培地を用いて 37℃で 2 代継代培養したものを実験に供した。

(2) 高圧処理における *E.coli* と *S. Typhimurium* の測定法

E.coli と *S. Typhimurium* の培養液は、8000rpm、10min の遠心分離を行い、その上澄みを除去した後に、pH7.0 のリン酸緩衝液に置換した。再び同様に遠心分離を行い、リン酸緩衝液に置換した。さらにリン酸緩衝液中の菌数が 10^8 CFU/mL となるように調整してグレイナー製のアンプルに充填した。これらの充填されたアンプルは高圧処理の試料とした。高圧処理後、アンプルから試料懸濁液を取り出し、ペプトン加生理食塩水を用いて段階希釈を行った。これらの希釈液は非選択培地である PCA 培地を用いて混釈し、37℃で 24 時間培養し、発育した集落を計測した。

(3) 高圧処理装置と処理方法

高圧処理装置は、高圧ポンプ、ヨークフレーム、圧力装置、制御盤から構成される加圧装置と恒温循環装置からなるスギノマシン社製を (HPV-80C20-S) を用いた。

加圧条件は *E. coli* と *S. Typhimurium* は 250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行った。なお、加圧媒体は精製水で処理を行った。

2. 高圧処理における食品媒介病原細菌の死滅効果の検討

(1) 供試菌株

実験に供した菌株は *E. coli* 及び食品媒介病原細菌として *S. Typhimurium*、*Salmonella Enteritidis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Cronobacter sakazakii*、*Providencia alcalifaciens*、*Yersinia enterocolitica* の計 7 菌株を用いた。なお、-80℃に保存してある菌株を取り出し、TSB 培地を用いて 37℃及び各菌株の至適温度で 2 代継代培養したものを実験に供した。

(2) 高圧処理における食品媒介病原細菌の測定法

各菌株の培養液は、8000rpm、10min の遠心分離を行い、その上澄みを除去した後に pH7.0 のリン酸緩衝液にて置換した。再び同様に遠心分離を行い、リン酸緩衝液に置換した。リン酸緩衝液中の菌数が 10^8 CFU/mL となるように調整してグレイナー製のアンプルに充填した。これらの充填されたアンプルは高圧処理の試料とした。高圧処理後、アンプルから試料液を取り出し、ペプトン加生理食塩水を用いて段階希釈を行った。これらの希釈液は非選択培地である PCA 培地を用いて混釈し、37℃及び各菌の至適温度で 24 時間培養し、発育した集落を計測した。

(3) 高圧処理装置と処理方法

高圧処理装置は、高圧ポンプ、ヨークフレーム、圧力装置、制御盤から構成される加圧装置と恒温循環装置からなるスギノマシン社製を

(HPV-80C20-S) を用いた。

加圧条件は 250MPa で *E.coli* 及びその他の食品媒介病原細菌は 250MPa で 180 分処理を行った。なお、加圧媒体は精製水で処理を行った。

3. 牛肝臓に接種した *E.coli* の高圧処理による死滅効果の検討

(1)供試菌株

実験に供した菌株は *E. coli* を用いた。なお、-80℃に保存してある菌株を取り出し、TSB 培地を用いて 37℃で 2 代継代培養したものを実験に供した。

(2)試料

牛の肝臓は東京都品川区にある芝浦屠場より購入した。研究室に搬入するまでは保冷バックに入れて搬入した。

(3)試料の調製

2 代継代した *E. coli* 10⁸CFU/mL の菌液を使用した。牛の肝臓を「横 2cm×縦 3cm, 厚さ 0.5cm 程度・重量 10g」の長方形にカットされたブロックに、*E. coli* の菌液を等間隔 10 カ所に合計 100 µl を接種した。接種した肝臓はプラスチックバックに入れてシールを行い、さらに同様に包装して、二重の密封状態にして高圧処理用の試料を作製した。

(4)高圧処理

高圧処理装置は、高圧ポンプ、ヨークフレーム、圧力装置、制御盤から構成される加圧装置と恒温循環装置からなるスギノマシン社製を (HPV-80C20-S) を用いた。

プラスチックバックの試料は高圧処理装置にセットし、加圧条件は 250MPa で 60 分、120 分、180 分の加圧処理を行った。

(5)生残菌数の測定

高圧処理後、プラスチックバックから内臓のブロックを取り出し、ストマッカーバックに内臓 10g と希釈水 90mL を分注して、2 分間のストマッキング処理を行い調製した。これらの調製液は希釈水を用いて段階希釈を行い、非選択培地である生菌数用の PCA 培地を用いて混釈し、37℃で 24 時間培養した。培養後発育した集落を計測した。さらに *E. coli* 数は選択培地である酵素基質培地; X-MG 培地 (日水製薬社製) を用いて混釈し、37℃で 24 時間培養し、発育した青色の集落を計測し、*E. coli* 数とした。

4. 高圧処理における肝臓の肉色と硬さの検討

(1)供試試料

実験に用いた牛の肝臓は、東京都品川区にある芝浦屠場より入手した。研究室に搬入するまでは保冷バックに入れて搬入した。

(2)試料の調製

牛の肝臓を「横 2cm×縦 3cm, 厚さ 0.5cm 程度・重量 10g」の長方形にカットされたブロックは、プラスチックバックに入れてシールを行い、さらにさらに同様に包装して、二重の密封状態にして高圧処理用の試料を作製した。

(3)高圧処理条件

プラスチックバックに密封された試料は、3.(4)に準じて高圧処理条件 250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行った。

(4)肝臓の肉色と肉質の変化

高圧処理後の肉色の変化を色差計で測定した。肉質の硬さはレオメーターを用いて測定した。

なお、目視で肝臓の肉色さらに肝臓を触感で硬さを確認した。

・色差計：ミノルタ社製の色彩色差計を使用した。

肝臓の色の変化を L 値、a 値、b 値で測定を行った。

・硬度計：サン科学社製のレオメーター、CR-3000EX を用いて行った。

肝臓の肉質の変化を硬度 (kgf/mm²) で測定した。

C. 結果

1. 高圧処理の圧力と時間が *E.coli* と *S. Typhimurium* に及ぼす死滅効果

リン酸緩衝液に懸濁した *E.coli* と *S. Typhimurium* における高圧処理 150MPa, 200MPa, 250MPa と処理圧力時間 60 分、120 分、180 分の結果を Fig. 1 及び Fig. 2 に示した。

高圧処理前のアンプル中の *E.coli* 未処理の菌数は 9 log CFU/mL であった。これらの菌液を 150MPa の高圧処理を行ったところ、60 分、120 分、180 分と処理時間が長くなるにつれて菌数が減少する傾向が見られるものの、有効な死滅効果は認められなかった。次に 200MPa では 60 分処理で 7 log CFU/mL, 120 分処理で 6 log CFU/mL, 180 分処理で 5 log CFU/mL と直線的に菌数が減少する傾向が認められた。250MPa では 60 分処理では 9 log CFU/mL から 6 log CFU/mL と約 3 D の死滅効果が得られ、120 分処理では 5 log CFU/mL, 180 分処理では 3 log CFU/mL となり、約 5 D の有効な殺菌効果が認められた。

さらに *S. Typhimurium* でも同様に実験を行ったところ、未処理の菌数が 9 log CFU/mL のものが、150MPa では 180 分処理で 7 log CFU/mL に減少した。200MPa では 60 分処理で 8 log CFU/mL に、180 分処理では 6 log CFU/mL に減少し、3 D の死滅が認められた。250MPa では 150 や 200MPa に比べて菌数の減少効果は高く、60 分処理では 6 log CFU/mL に、120 分処理では 4 log CFU/mL, 180 分処理では 3 log CFU/mL にまで減少した。*S. Typhimurium* は *E. coli* よりも高圧による影響を強

く受ける傾向が認められ、*E. coli* と *S. Typhimurium* はいずれも約 5 D の有効な殺菌効果が認められた。

以上の結果、低圧の 250MPa でも高圧処理の時間を数十分の単位から時間の単位に延長することにより、高圧の 400MPa と同等の殺菌効果が得られることが確認された。さらに、処理時間の延長は緩やかな殺菌効果であるものの、有効な殺菌効果を得ることが可能であると推察された。

2. 高圧処理における食品媒介病原細菌の死滅効果の検討

次に前実験の結果を踏まえ、他の食品媒介病原細菌に対する 250MPa で 180 分処理を行った結果を Fig. 3 に示した。

各食品媒介病原細菌の未処理での菌数は、約 8 ~9 log CFU/mL であった。これらの菌液をアンプルに封入して 250MPa で 180 分処理を行った結果、生残菌数は *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* と *E. coli* では 3 log CFU/mL となり、未処理の菌数と比較して 5 オーダーの殺菌効果が認められた。さらに *C. sakazakii* では 2 log CFU/mL, *Y. enterocolitica*, *P. alcalifaciens*, *S. Enteritidis* の 3 菌種では 2 log CFU/mL 以下の数値で検出され、高圧に対する感受性が高い結果であった。

以上の結果、食品媒介病原細菌 6 菌種について 250MPa で 60 分処理を検討したところ、5 D の有効な殺菌効果が認められ、*E. coli* のみではなくグラム陰性の病原菌にも有効であることが明らかとなった。

3. 牛肝臓に接種した *E.coli* の高圧による死滅効果の検討

予備実験により高圧処理が *E. coli* に対して有効な死滅効果が認められたことから、次に牛肝臓に *E. coli* を接種し、高圧処理 250MPa, 60 分、120 分、180 分処理による肝臓中の *E. coli* の不活化を検討した結果を Fig. 4 に示した。

高圧未処理の肝臓からは生菌数及び *E. coli* 数は $7 \log \text{CFU/g}$ を示した。これらを 250MPa で 60 分、120 分、180 分の処理を行ったところ、60 分処理では生菌数及び *E. coli* 数は 1 D の減少、さらに 120 分処理では 2 D の減少が認められた。さらに 180 分では生菌数で 3 D、*E. coli* で 2 D の死滅が認められた。これらの結果はリン酸緩衝液に懸濁して処理した結果より殺菌効果が劣る結果であった。今後は他の菌株や条件により異なることも考えられることからより詳細な検討並びにデータの構築が必要と考えられた。肝臓には高圧処理に対して保護効果や保護物質の存在の影響がある可能性も考えられた。

4. 肝臓の色調と硬さに及ぼす高圧処理と処理時間の影響

高圧処理 250MPa で 60 分、120 分、180 分処理による肝臓の肉色の変化を色彩色差計で測定した結果を Table 1 に、写真を Fig. 5 に示した。未処理の肝臓の肉色は L 値が 34.14 ± 0.93 、a 値が 9.50 ± 0.23 、b 値が 4.43 ± 0.50 であった。250MPa の圧力処理を行うと 60 分処理で L 値が 41.74 ± 0.48 、a 値が 16.17 ± 0.51 、b 値が 7.04 ± 0.79 となり、高圧処理では L 値である明度が明るくなる傾向が観察され、さらに a 値の赤みはより赤くなる傾向が観察された。120 分処理では L 値が 43.33 ± 1.17 、a 値が 15.71 ± 0.93 、b 値が 7.18 ± 1.26 となった。さらに 180 分処理では L 値が 45.68 ± 0.95 、a 値が 14.29 ± 0.38 、b 値が 7.21 ± 0.62 となり、圧力処理時間の延長とともに肝臓の色彩は、明るい色を示し、高圧処理を行うと赤みが増加するが、処理時間が長くなるにつれて僅かであるが減少する傾向が認められた。

次に高圧処理における肝臓の硬さの変化を Table 2 に、写真を Fig. 6 に示した。肝臓の肉質は柔らかい傾向があるが、高圧処理を行うと硬さが増加することが前回の実験で判明している。そこで、今回はレオメーターを用いて肝臓の硬さについて検討を行った。肝臓の硬さは、硬度の数値で

示した。未処理の状態では $0.0152 \pm 0.0068 \text{ kgf/mm}^2$ を示し、250MPa では 60 分処理を行うと $0.0246 \pm 0.0046 \text{ kgf/mm}^2$ 、120 分処理では $0.0249 \pm 0.0048 \text{ kgf/mm}^2$ 、120 分処理では $0.0343 \pm 0.0088 \text{ kgf/mm}^2$ の数値が得られた。肉の硬度は 250MPa の圧力では時間の経過とともに数値は高区なる傾向を示した。しかし、触感では明らかに硬いと思われる感触ではなかった。

Table 3 に高圧処理による肝臓の目視及び触感の結果を示した。未処理と高圧処理との間には明らかな相違が観察されたものの、高圧後は肝臓の肉色は未処理のものより赤みがかかった色彩を示した。しかし、処理時間に関しては感覚的に色合いや硬さについては処理を行うことによって顕著な差は感じられなかった。

D. 考察

前年度に引き続き高圧処理による牛肝臓中の *E. coli* の不活化を検討した。昨年度の結果を踏まえて、高圧条件を 400MPa～500MPa のような高い圧力ではなく、150～250MPa の比較的低い圧力での *E. coli* の不活化の検討を行った。その結果、150MPa では有効な殺菌効果は見られなかったが、200MPa から殺菌効果が認められ、特に今回検討した 250MPa は処理時間の経過とともに殺菌効果が高まる傾向が認められた。250MPa で 180min では食品媒介病原細菌の低減化に有効な結果が得られ、*P. aeruginosa*、*E. coli*、*S. Typhimurium* では 5D の死滅効果がみられ、さらに *S. Enteritidis*、*P. alcalifaciens*、*C. sakazakii*、*Y. enterocolitica* では 6D 以上の殺菌効果が得られた。このような結果から、実際の肝臓に *E. coli* を接種して高圧処理 (250MPa で 180min) を行った結果では、2 D 程度の死滅効果しか得られなかった。緩衝液に懸濁した殺菌効果と肝臓に接種した実験結果ではかなり異なる結果となり、さらに処理条件である圧力と処理時間の検討が必要であると思われる。一方、肝臓の物理的な肉質に関連して 150～250MPa で 60 分、120 分、180 分処理を肝臓に施したところ、肉色につ

いては150MPaから200MPa、200MPaから250MPaと高い圧力になるほど明るい色調を示した。500MPaの高い圧力に比べて色調の変化は少なく、良い肝臓の色調を維持し、やや赤みがかかった色合いであった。肝臓の硬さについては、250MPa処理を行うと硬さの数値は高くなる傾向が見られるものの、未処理のものに比較してやや硬くなる傾向が認められているが、生肝臓と比較しない限り明瞭な違いは見られなかった。

高圧処理は肝臓中の *E.coli* (腸管出血性大腸菌) のリスク低減には有効と考えられるが、これらの高圧条件に更なる有効な殺菌方法を組み合わせた処理法の検討が必要であると考えられた。一方、肝臓(生レバー)としての食味と食感は異なることとなり、生レバーとしての価値が見いだせるものか不明瞭で検討の必要があると考えられる。肝臓の物理的な変化は従来の400MPa~500MPaの圧力と異なり、比較的穏和な処理のため肝臓の色合いや柔らかさは残存し有効であると考えられた。最終的には専門的な官能検査も必要となると考えられた。

以上のことから、250MPaで180分処理の高圧処理は、肝臓のそのものは顕著な肉色や肉質の変化は認められなかったものの、やや *E. coli* に対する不活化効果は十分ではない結果となった。今後は加圧処理時間の延長やさらなる不活化データの構築も必要と考えられた。最終的には実際に腸管

出血性大腸菌を用いた殺菌効果の検討や製造工程においても一貫した衛生管理システムの導入が必要であると考えられた。

E. 結論

高圧処理の250MPaで180分処理は、食品媒介病原細菌の菌数低減には有効であった。牛肝臓に対する影響は、色いや硬さの面でやや赤みや硬さの変化が認められるものの一定の評価が得られた。次年度は更なる有効な殺菌データの構築が必要で、特に相乗効果により病原菌のリスク低減のための検討を進める予定である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

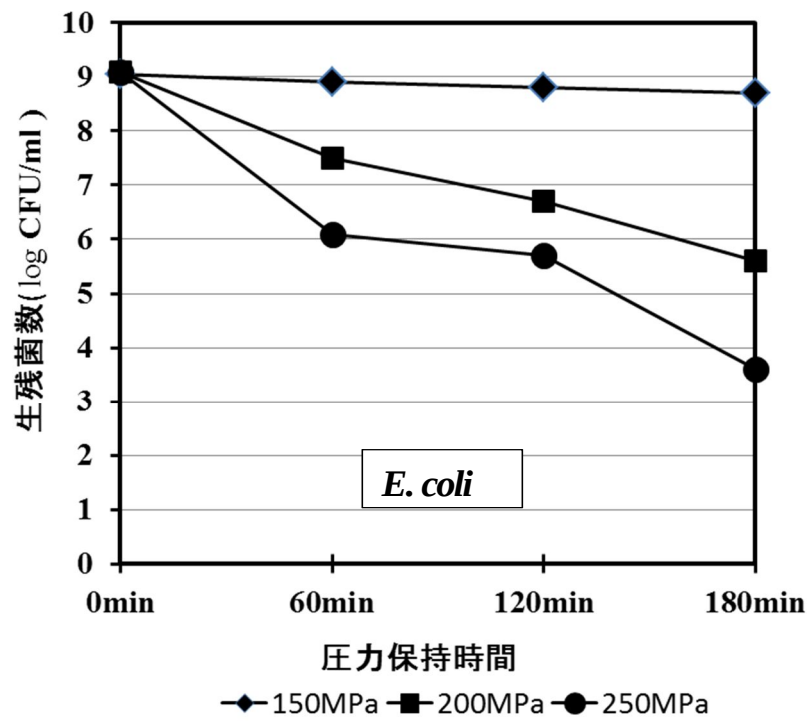


Fig. 1 高圧処理の圧力と時間が *E.coli* の死滅に及ぼす影響

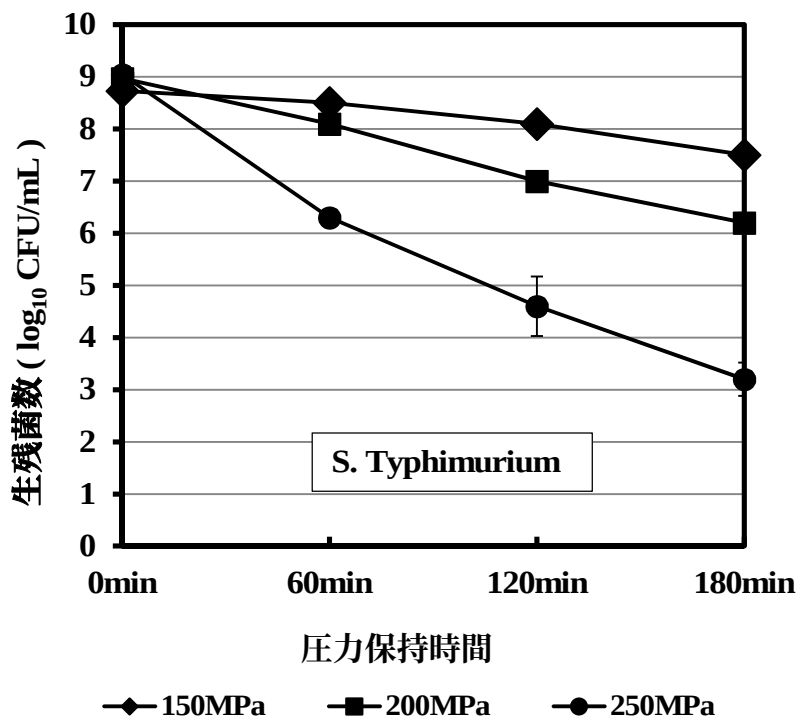
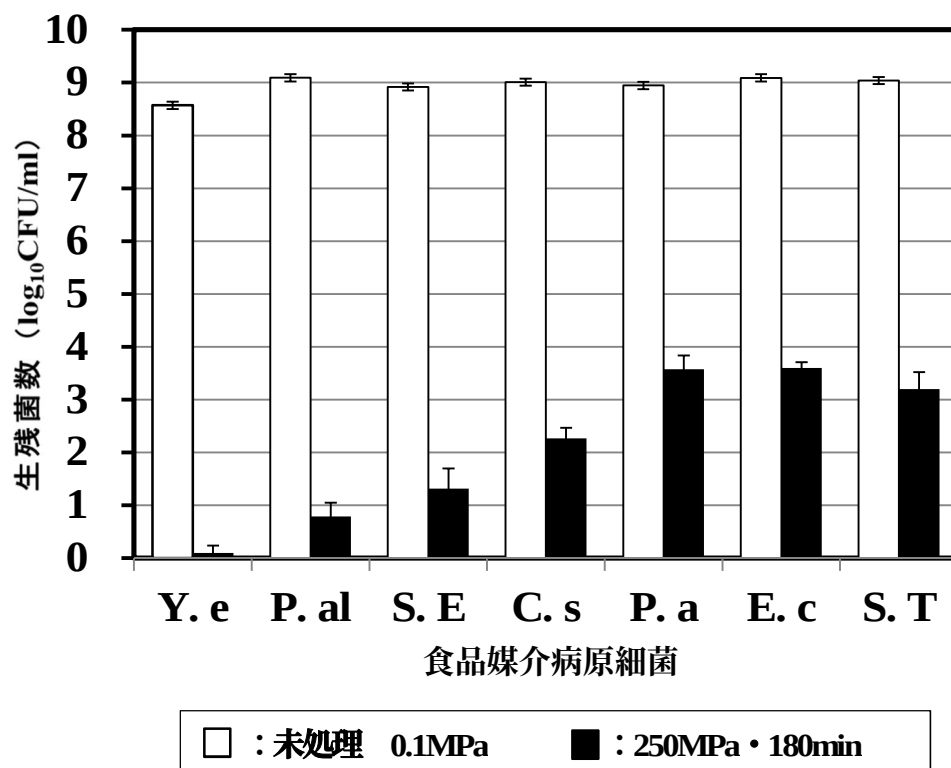


Fig.2 高圧処理の圧力と時間が *S. Typhimurium* の死滅に及ぼす影響



Y.e : *Yersinia enterocolitica*

P. al : *Providencia alcalifaciens*

S. E : *Salmonella Enteritidis*,

C. a : *Cronobacter sakazakii*,

P. a : *Pseudomonas aeruginosa*,

E. c : *Escherichia coli*

S. T : *Salmonella Typhimurium*

Fig. 3 高圧処理が食品媒介病原細菌の死滅に及ぼす影響

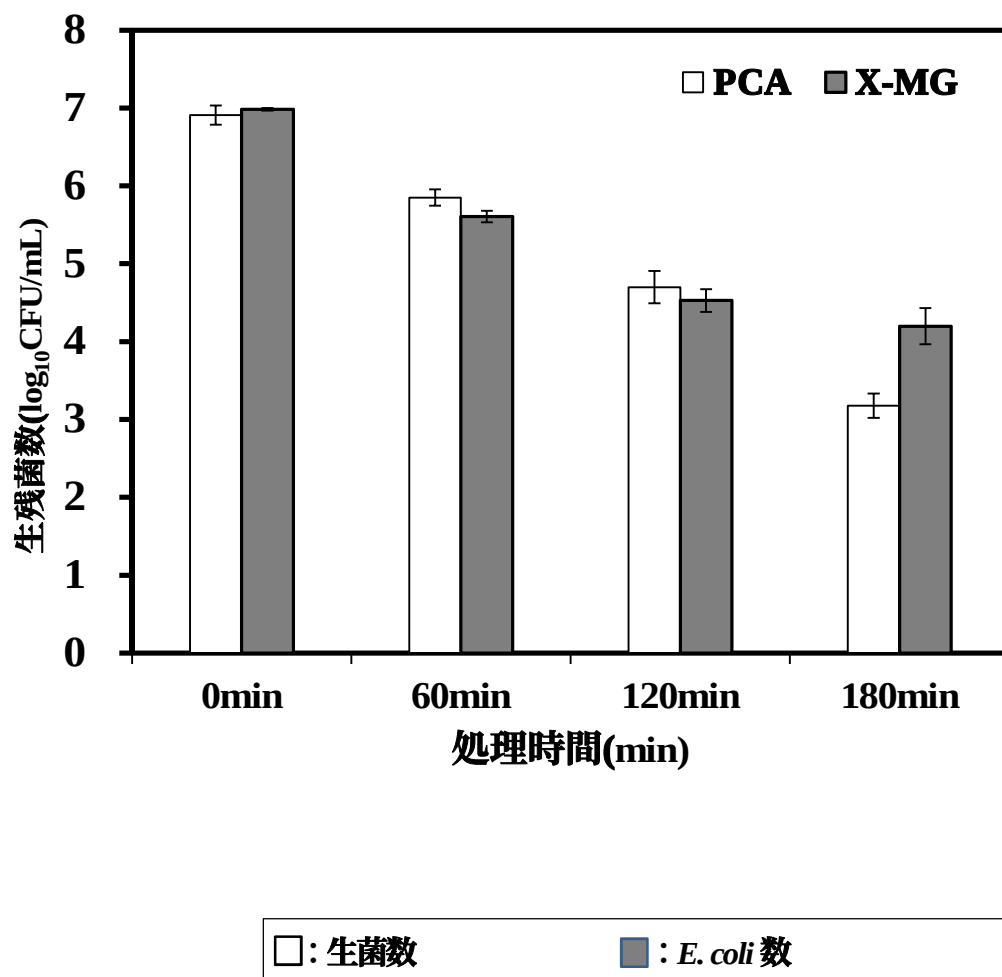
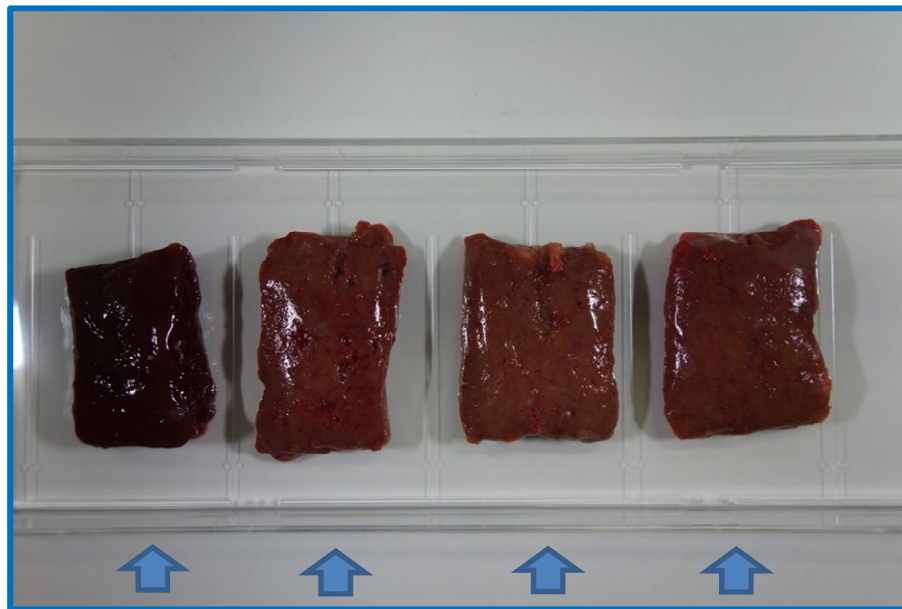


Fig. 4 肝臓に接種した *E.coli* の高圧処理による死滅効果



0.1MPa	60min	120min	180min
	250MPa	250MPa	250MPa

Fig. 5 高圧処理の圧力と時間が肝臓の肉色に及ぼす影響

Table 1 高圧処理の圧力と時間が肝臓の色差に及ぼす影響

圧力条件 (時間)	L 値	a 値	b 値
0 min	34.14±0.93	9.50±0.23	4.43±0.50
60 min	41.74±0.48	16.17±0.51	7.04±0.79
120 min	43.33±1.17	15.71±0.93	7.18±1.26
180 min	45.68±0.95	14.29±0.38	7.21±0.62

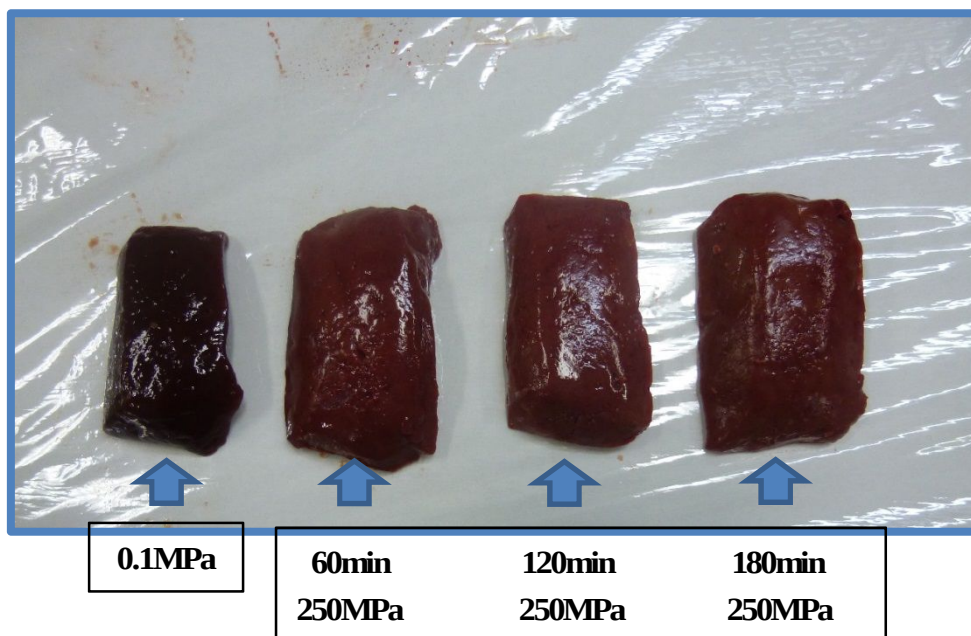


Fig 6 高圧処理の圧力と時間が肝臓の肉質に及ぼす影響

Table 2 高圧処理の圧力と時間が肝臓の硬さに及ぼす影響

圧力条件(時間)	最大荷重(g)	硬度 (Kgf/mm ²)
0.1Mpa • 0min	247.73±139.92	0.0153±0.0068
250MPa • 60min	469.97±127.61	0.0246±0.0046
250MPa • 120min	523.33±156.63	0.0249±0.0048
250MPa • 180min	670.33±124.42	0.0343±0.0088

Table 3 高圧処理（250MPa）による肝臓の色と硬さの変動

圧力条件(時間)	肉色	柔らかさ・硬さ
0.1Mpa・ 0min	鮮明な赤褐色	柔らかい
250MPa・ 60min	やや鮮明な赤褐色	やや柔らかい
250MPa・ 120min	やや鮮明な赤褐色	やや柔らかい
250MPa・ 180min	やや鮮明な赤褐色	やや柔らかい

海外の食肉や内臓肉の生食実態に関する基礎的情報 の収集支援業務（その2） 報告書

2015 年 1 月

MRI 株式会社三菱総合研究所
人間・生活研究本部

目次

1. 実施の目的・内容	1
2. 方法	2
3. 調査結果	3
3.1 ドイツの豚生肉料理について	3
3.1.1 ソーセージの定義や種類	3
3.1.2 商品提供の形態	7
3.1.3 日本国内の商品提供事例	8
3.2 メットに由来する食中毒等への対策	8
3.2.1 EUにおける食品安全対策の枠組み.....	8
3.2.2 ドイツにおける食品安全対策	11
Verwendetes Ausgangsmaterial	18
3.2.3 製造販売業者の自主規制	19
<参考情報>	21

1. 実施の目的・内容

2011 年、牛のユッケの生食により複数の死者と多数の患者が発生した集団事例が起きたことから、牛生食肉によるヒトへの健康被害に関するリスク評価が行われ、その結果として厳しい規格基準が施行されるとともに、牛肝臓の生食が禁止されたところである。一方、海外においてもタルタルステーキやユッケなど、郷土料理・伝統料理に供する調理方法として動物の食肉や内臓肉を生で食することがあり、ここでの食中毒防止のための規制等の内容や考え方が我が国にも参考となる可能性がある。

平成 25 年度は、動物の食肉や内臓肉を生で食する実態の基礎的調査として、海外における牛、豚、鶏、野生動物などの食肉や内臓肉の生食の習慣に関する情報の収集・整理を行った。

そこで今年度はこの結果を踏まえ、ドイツの豚生肉料理（メット）に着目し、原料肉や製造工程の衛生管理、最終製品の規制状況等について調査し、我が国における生食の総括管理に資する基礎的情報の収集を支援することを目的とする。

2. 方法

ドイツの豚生肉料理（メット）の衛生管理等について、インターネット検索や文献検索等によって収集・整理した。

(1) ドイツの豚生肉料理について

- ソーセージの定義や種類について、その定義や分類を整理した。
- 商品提供の形態として、肉屋での陳列、パック詰め、瓶詰めの形態例をまとめた。
- 日本国内での販売事例を調査した。

(2) メットに由来する食中毒等への対策

- EU 加盟国共通の食品安全対策の体系についてまとめた。
- ドイツにおける食品安全対策についてまとめた。

3. 調査結果

3.1 ドイツの豚生肉料理について

3.1.1 ソーセージの定義や種類

ドイツの豚生肉料理として代表的なものはソーセージである。ドイツにおいて、ソーセージは、大きさや形によって名称が変化する。日本で一般的に「ソーセージ」と呼ばれている小型・細めのタイプは Warstchen（ヴェルストヒェン）であり、大型・太めで、薄切りにするタイプは Wurst（ヴルスト）と呼ばれる。豚生肉料理としては、ソーセージの他に、ハム（Schinken）などがある。

ドイツのソーセージは、製造方法によって、さらに Rohwurst（ローヴルスト）、Brühwurst（ブリューヴルスト）、Kochwurst（コッホヴルスト）の3種類に大別される。

ローヴルストは非加熱ソーセージであり、生の牛肉あるいは豚肉に、脂身、塩、香辛料を加えて作る。肉と脂身は粗挽きや細挽きにされ、レシピに従って、塩と香辛料が添加され、豚腸や羊腸等の天然ケーシングや人工ケーシングに充填される。その後、冷燻（常温で乾燥、熟成）させる。乾燥・熟成のみでそのまま製品として出荷されるものもあるが、多くのローヴルストは乾燥後、くん煙をかけてスモークされる。メットヴルストは、このローヴルストの一種である。肉の配分比率や挽き方、また添加する香辛料などの種類や分量、さらに乾燥やくん煙にかかる時間など、いずれのヴルストの製造工程も、製品の味や香り、硬さ、そして熟成度を左右する重要なポイントとなる。

ローヴルストは、パンなどに塗って食べるスプレッドタイプのものと、スライスあるいはそのまま食べるタイプのものとに分けられる。スプレッドタイプは、スライスタイプのものよりも品質保持期限が短い。ただし、スプレッドタイプのヴルストを加熱処理し、ビン詰あるいは缶詰にした製品も作られており、これらは長期保存が可能である。

図表 3-1 ローヴルストのイメージ¹



¹ <http://www.newsdigest.de/newsde/features/3539-sausage-german-gourmet.html>

ブリューヴルストはいわゆる茹でソーセージでウインナーやフランクフルトがこれに含まれる。生の牛肉や豚肉を脂身と混ぜ合わせ挽肉にして作る。肉を挽く際に、肉の温度を下げ、全体が均質に混ざるように、かき氷状に砕いた氷または冷水を一緒に加える。そしてこの挽肉に、それぞれのヴルストのレシピに適したスパイスや塩を加えて肉生地にし、これを天然ケーシングあるいは人工ケーシングに詰め、加熱処理する。ヴルストによっては加熱前あるいは加熱後にくん煙をかけるものもあり、加熱をすることで、ある程度の硬さを持ち、スライスしやすいヴルストとなる。

図表 3-2 ブリューヴルストのイメージ²



コッホヴルストはあらかじめ肝臓、内臓、舌などの部位で、加熱した肉を材料として用いる。内臓や脂身、あるいは血液といった様々な材料を加え、さらにスパイスや塩と混ぜ合わせて生地を作り、天然あるいは人工のケーシングに充てんして、もう一度加熱する。またレシピによっては、この後にくん煙をかけ、スモークの芳香を効かせるヴルストもある。コッホヴルストはブリューヴルストと違い、冷たい状態でのみスライスが可能で、日持ちもあまりしないことから、冷蔵保存が必要となる。現在ではビン詰めや缶詰にされた製品もある。

図表 3-3 コッホヴルストのイメージ³

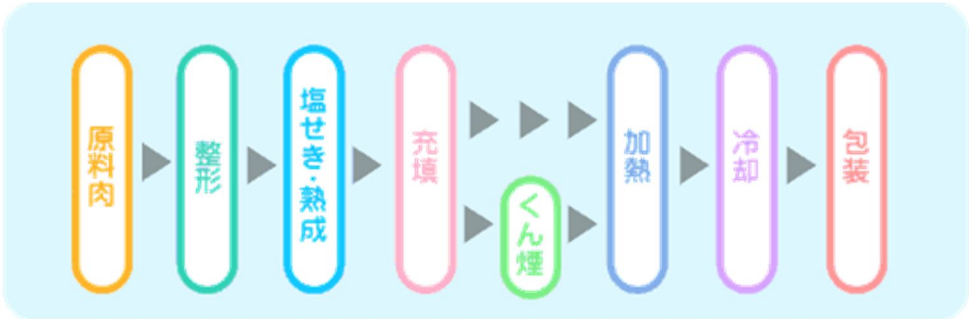


²<https://deutschlandtomo.wordpress.com/2010/08/19/%E3%82%BD%E3%83%BC%E3%82%BB%E3%83%BC%E3%82%B8/>

³ <http://achso.blog67.fc2.com/blog-entry-52.html>

ハムとソーセージの大きな違いは下図に示すとおり、整形した肉を用いるのか、ミンチした肉を用いるのかという点である⁴。ハムは整形した肉に食塩や香辛料、発色剤などを加えて低温で漬け込んでから加工するため、pH 値が変化する。

図表 3-4 ハムの製造工程



図表 3-5 ソーセージの製造工程



メットヴルストは、前述のとおりローヴルストの一種であり、脂肪を含まない豚のひき肉（Mett）を使用したソーセージである。メットヴルストはドイツ国内の地方によって複数種類ある。北部では硬く、サラミに近いものを指し、南部やオーストリアでは、Streichmettwurst や Zwiebelmettwurst のような柔らかいものを指すことが多い。パンと一緒に食べるのが一般的である。

このように、ドイツでは製造方法によってソーセージの呼称を分類しているが、日本では JAS 法に基づいて、以下のように分類している⁵。

図表 3-6 JAS 法による日本の製造法の分類

分類名	概要
クックドソーセージ	湯煮又は蒸煮により加熱したソーセージ
ドライソーセージ	加熱しないで乾燥したソーセージ (水分が 35%以下)
セミドライソーセージ	加熱又は加熱しないで乾燥したソーセージ (水分が 55%以下)
無塩漬ソーセージ	塩漬していないソーセージ

⁴ <http://www.itoham.co.jp/library/seizou/seizou.html>

⁵ <http://www.ham-murakami.co.jp/meister/meister01.html>

図表 3-7 ドイツソーセージの製造工程⁶
(①原料肉②調味料③熟成④カット・調理)



⁶ http://www.raps.com/fileadmin/Daten/media/DeliCo/Print/Rohwurst_2014.pdf

3.1.2 商品提供の形態

メットヴルストはドイツ国内の肉屋で販売されている。

肉屋では、精肉（Fleisch）とともに、ソーセージ（Wurst）、ハム（Schinken）やベーコン（Speck）などの肉加工品を扱う。販売は対面販売である。各調理法に合わせて、既にカットされている場合もあるが、大きな塊の肉から、好みの大きさや厚さに切り分けて貰うこともできる。

図表 3-8 肉屋での陳列イメージ⁷



また、パック詰めや瓶詰めされた製品はスーパーなどの小売店で販売されている。

図表 3-9 メットヴルストの製品画像（hofladen-austermann 社）



⁷ <http://www.tsujicho.com/oishii/recipe/letter/doitsu/fshopping04.html>

3.1.3 日本国内の商品提供事例

メットヴルストは国内でも販売されている。

新潟県佐渡市にある有限会社では、メットヴルストの販売を行っている。メットヴルストは新潟県産の豚肉を原材料として、食塩、香辛料、発色剤（亜硝酸 Na）を加えて製造し、パック詰め状態で販売されている。保存方法は 10℃以下、保存期限は 30 日とされている。

メットヴルストは、平成 5 年 ナチュラルサラミ（生サラミ）製造の法改正を契機に販売が開始された。このメットヴルストは各種メディアで取り上げられており、TV 番組（バラエティ番組、情報番組）、雑誌（女性誌）などで多数紹介されている。

岐阜県関市にある企業では、店頭および通信販売でオニオンメットヴルストを販売している。原材料等の詳細は不明である。

愛知県名古屋市にあるハム製造会社では、ペースト状のメットヴルストを販売している。岐阜県産の豚肉を原材料として、岩塩（ドイツ産）、スパイス（自家配合）、発色剤（亜硝酸 Na）、ラム酒を加えて製造したものである。

3.2 メットに由来する食中毒等への対策

3.2.1 EU における食品安全対策の枠組み

EU は 1996 年の BSE 危機を契機に食品法の一般原則を見直し、2002 年に「一般食品規則（食品法の一般原則と要件決定および欧州食品安全局の設置と食品の安全のための手順決定に関する規則）178/2002⁸」を採択した。この新規則により、EU におけるあらゆる食品関連法の基本となる包括的な原則、定義、要件が規定された。

2002 年に採択された一般食品規則（規則 178/2002）を受け、2004 年には食品衛生管理に関する実施規定を含んだ一連の規則（衛生パッケージ：Hygiene Package）が策定された。この規則は「一般食品衛生規則（規則 852/2004）⁹」「動物由来食品特別衛生規則（規則 853/2004）¹⁰」「動物由来食品特別公的統制規則（規則 854/2004）¹¹」「公的統制規則（規則 882/2004）」の 4 つの規則と、「家畜衛生規制強化指令（指令 2002/99/EC）¹²」「旧指令

⁸ Regulation (EC) No178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principle and requirement of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety

⁹ Regulation (EC) No 852/2004: Hygiene of foodstuffs

¹⁰ Regulation (EC) No 853/2004: Specific hygiene rules for food of animal origin

¹¹ Regulation (EC) No 854/2004: Official controls on products of animal origin

¹² COUNCIL DIRECTIVE 2002/99/EC: the animal health rules governing the production, processing, distribution and introduction of products of animal origin for human consumption

等廃止指令（指令 2004/41/EC）¹³」の 2 つの指令からなる。

さらに、2005 年には Codex 等の国際機関の原則に従い、新たに食品の微生物規格基準に係る規則¹⁴を策定した。この規則は、食中毒菌とそれらの毒素・代謝産物に関する規格基準を定めた食品安全基準（Food Safety Criteria）と、食品製造工程の正確な機能を示した工程衛生基準（Process Hygiene Criteria）からなる。

現在の EU 食品安全法の体系は、上述の一般食品規則（規則 178/2002）のもとに、衛生パッケージを含む 5 本の規則を核として成立している。なお、これらの EU の食品安全法制は、EU に輸入される食品に対しても適用される。

一般食品規則（規則 178/2002）の第 17 条では、食品・飼料事業者は関係法の要件を満たす必要があること、加盟国は事業者によって関連法の要件が満たされていることを監視・検証することとされている。この加盟国による事業者のコンプライアンス検証に関する原則や枠組みを示した法令が公的統制規則（規則 882/2004）にあたり、この第 3 条では加盟国による公的統制の原則が示されている。具体的には、リスクに基づき頻度を決定する、事前通知なしで実施する、フードチェーンのすべての段階で実施する、および輸出入品も含め EU 域内で販売される製品は統制対象とすることが示されている。

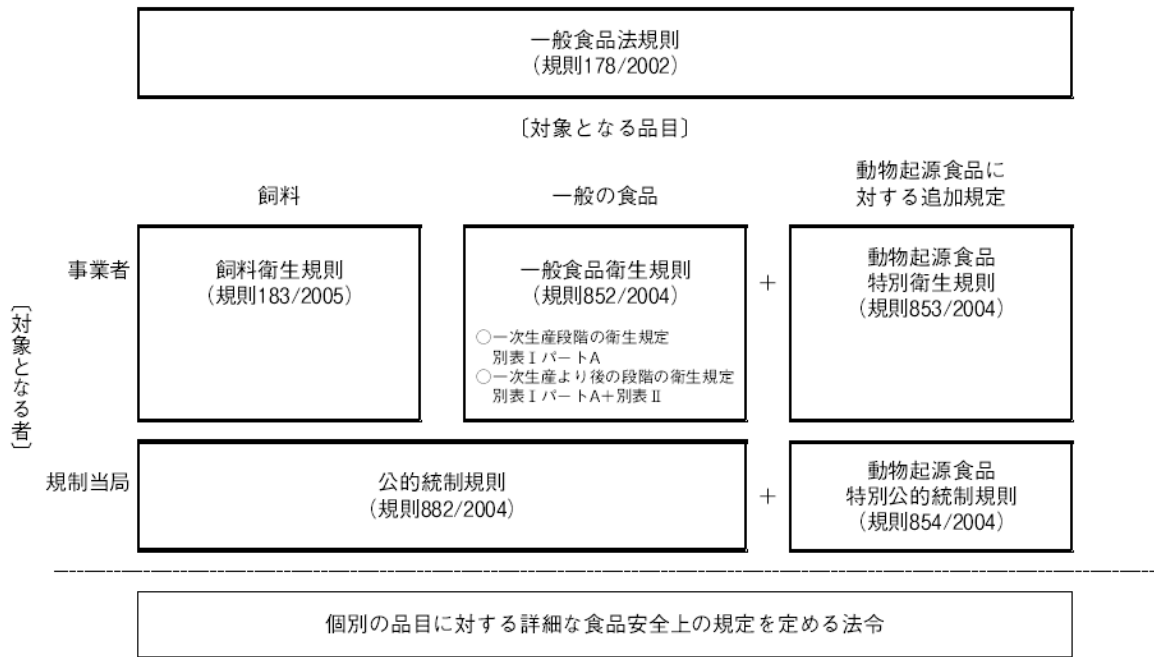
加盟国は欧州委員会に公的統制に関する包括的計画とその結果を報告書として提出することが求められる。また、欧州委員会の下部組織である食品獣医局（FVO）は、加盟国において公的統制が適切に実施されているかを監査という形で検証している¹⁵。

¹³ DIRECTIVE 2004/41/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 21 April 2004 repealing certain Directives concerning food hygiene and health conditions for the production and placing on the market of certain products of animal origin intended for human consumption and amending Council Directives 89/662/EEC and 92/118/EEC and Council Decision 95/408/EC; OJEC L157,30.4.2004,pp.33-44.

¹⁴ Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs

¹⁵ 工藤春代「ドイツにおける食品安全コントロールシステム－日本の課題に照らして－」フードシステム研究第 19 巻 2 号（2012）」

図表 3-10 EU の食品安全法制の体系



(出典) 樋口修「EU の食品安全法制—輸入食品規制を中心として—」レファレンス平成 20 年 10 月号

3.2.2 ドイツにおける食品安全対策

(1) 概要

EU 加盟国であるドイツでは、上述の EU 食品安全法に適合する形で食品安全対策を実施している。

ドイツは連邦制をとっており、16 の州 (Länder) からなる。連邦レベルで食品・飼料安全を包括的に所管する機関として連邦食糧・農業省 (BMEL) があり、その下部組織に連邦消費者保護・食品安全庁 (BVL)、連邦リスク評価研究所 (BfR)、連邦農業・食品局 (BLE)、その他研究機関 (FLI、JKI、MRI) が設置されている。その他、一部領域については、連邦環境自然保護原子力安全省 (BMUB)、連邦財務省 (BMF) および連邦司法消費者保護省 (BMJV) がそれぞれ管轄している。

憲法にあたるドイツ基本法の第 30 条には、食品・飼料安全に対する連邦および州の責任が規定されており、第 83 条では法律の実行は州が行なうと定められている。公的な監視や食品のモニタリングプログラムは各州の責任によって行われ、連邦政府がこれら公的統制について各州に指示を行なう権限はない (ただし、各州からの監視結果のとりまとめおよび報告書の公表については BVL が実施)。食品のモニタリングや獣疫に関する規制当局は行政区画ごとに設置され、その運用も独立している¹⁶。

(2) 食肉に関する規制・監視

1) 関連法令

動物由来食品に関する連邦レベルの法令としては、「動物由来食品衛生規則 (Tier LMHV)¹⁷」「動物由来食品監視規則 (LMÜV)¹⁸」がある。この他、食品表示については「食品表示規定 (LMKV)¹⁹」で、消費者への情報提供については「消費者情報提供規定 (VIG)²⁰」でそれぞれ規定されている。これら連邦レベルの法令の他、各州レベルの法令も存在する。

動物由来食品衛生規則 (Tier LMHV) の第 5 章 (少量の食品、小売販売および規則 853/2004 適用範囲内食品の製造、取扱い、販売に関する共通要件) 第 16 条 (ひき肉及び肉製品に関する注意表示) では、「家禽肉もしくは馬肉を使用、あるいはひき肉を含む」および「機械分離肉を使用、あるいは肉製品を含む」に関しては、「必ずパッケージに『よく火を通してお召し上がりください (Vor dem Verzehr durcherhitzen!)』という注意書きを表示して販

¹⁶ FVO Country Profile Organisation of Official Controls—Germany
http://ec.europa.eu/food/fvo/controlsystems_en.cfm?co_id=DE.

¹⁷ Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung (Tier-LMHV)
<http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/tier-lmhv/gesamt.pdf>

¹⁸ Tierische Lebensmittel-Überwachungsverordnung (LMÜV)

¹⁹ Lebensmittelkennzeichnungsverordnung (LMKV)

²⁰ Verbraucherinformationsgesetz (VIG)

売しなければならない」との規定がある。

また、第7章（最終規定）第25条（経過規定）の添付5第2項（ひき肉および食肉製品の製造、取扱い）において、メットの材料となるひき肉の製造及び取扱いに関する要件が定められている。ひき肉の製造加工に関する具体的な要件を以下に示す。

図表 3-11 ひき肉の製造加工に関する要件

ひき肉および食肉製品の製造加工、取扱いの際には以下の要件を満たすこと。	
1. 製造加工施設の要件	
1.1	ひき肉および食肉製品は、3の衛生要件を満たす下記の設備を備えた施設で製造加工されなければならない。
1.2	肉、ひき肉もしくは食肉製品に触れた従業員の汚れが拡散しないための手洗いの設備
1.3	機械器具の消毒のため 82℃以上の水による洗浄、もしくは同等の効果が得られるシステム
2. 原材料の要件	
2.1	ひき肉および食肉製品の製造加工には、認可された屠ちく場 ²¹ （zugelassenen Schlachthöfen）、解体施設、ジビエ加工施設もしくは小売販売施設からの新鮮な肉のみを使用しなければならない。 あるいは、規則 852/2004 第1章 2c もしくは規則 853/2004 第1章 3e に定められたジビエもしくは規則 853/2004 第1章 3e に定められた狩猟者による狩猟物を使用しなければならない。 2013年12月31日以前については、(EC)規則 852/2004、853/2004、854/2004、882/2004 施行のための経過規定を決定した 2009 年 11 月 30 日の委員会で採択された規則 1162/2009 第2章に定められた生産者からの肉を使用しなければならない。
2.2	ひき肉には脂肪の付着した骨格筋のみを使用することができる。 ただし、ひき肉には解体切断の際に生じた筋肉組織以外の肉片、機械分離肉、骨片や皮膚が付着した肉、咀嚼筋以外の頭部、線維が多い腹筋部、手足根部および横隔膜の骨片・組織を使用することはできない。
2.3	ひき肉を使用もしくは含む食肉製品は、2.1 を満たした上で以下の要件を満たすこと。 2.2 かつ以下の条件を満たすひき肉のみを使用することができる。 853/2004 添付 3 第5項第3章 3d に該当する解体切断の際に発生した肉片または機械分離肉を使用もしくは含む肉製品は、2.2 に関わらず、消費にあたって必ず加熱調理されなければならない。
3. 製造前後の衛生に関する要件	
3.1	ひき肉もしくは食肉製品の製造時には、家禽肉は 4℃、内臓、骨、皮、体毛、血液な

²¹ ここでいう「認可」とは、規則 No 853/2004 の第2章第4条：Registration and approval of establishments の規定に基づくものを指している。同規則において「規則 No 853/2004 付属文書II及びIIIで基準を定める製品を取り扱う施設は規制当局の承認を受けなければならない（ただし一次生産、輸送、及び温度管理を要しない製品の保管のみを行うもの、あるいは第1条第5（b）項に従い本規則が適用されるもの以外の小売は除く）」とある。付属文書IIIにおいて具体的な畜場の要件が示されている。

どは 3°C、その他の肉は 7°Cを超えてはならない。肉は 1.に定められた施設で加工されなければならない。

3.2 ひき肉もしくは食肉製品は冷凍または急速冷凍された肉を使用することができる。ただし、冷凍前に骨が除去されている、もしくは製造直前において骨の除去が管轄庁より認められた肉でなければならない。

3.3 製造場所で消費者に供給されないひき肉もしくは食肉製品は、製造後ただちに覆いをかけるか包装しなければならない。その際ひき肉は 2°C、肉製品は 4°C以下で冷蔵されるかマイナス 18 度以下で冷凍されなければならない。1.に定められた施設でも上記の温度を保つこと。

3.4 3.3 に定められたひき肉もしくは食肉製品は解凍後再び冷凍されてはならない。

食肉加工品²²の製造のみに使用されるひき肉もしくは食肉製品は本章の要件を満たさなくともよい。

2) 法令遵守状況の監視・モニタリング

動物由来食品に対する公的な監視については連邦食糧・農業省（BMEL）が中央所管官庁であり、その 323 部署が食品衛生および食肉衛生を担当している。また、環境汚染物質による食肉等の食品の汚染防止については連邦環境自然保護原子力安全省（BMUB）が所管官庁となっている。連邦消費者保護・食品安全庁（BVL）は BMEL および BMUB にデータを提供するとともに、これらの所管省庁と協働しながら業務を遂行する。連邦リスク評価研究所（BfR）はリスク評価を行い、BMEL、BMUB、BVL および各州に対し科学的な助言を行なう。

法令遵守に対する公的な監視や食品モニタリングプログラムは各州の責任において実施されており、各州の獣医・食品所管官庁（DMA）がその役割を担っている。なお、実際に監視を行うのは州の下にある地方自治体である郡あるいは郡独立市の獣医局等であり、食品企業や飲食店等の監視項目としては、設備、作業方法、衛生要件の遵守、トレーサビリティ、企業の自己検査、表示・宣伝等がある。その他、農場段階での監視としては、動物衛生・福祉や飼料に関する法令の遵守状況についてチェックを行っている²³。

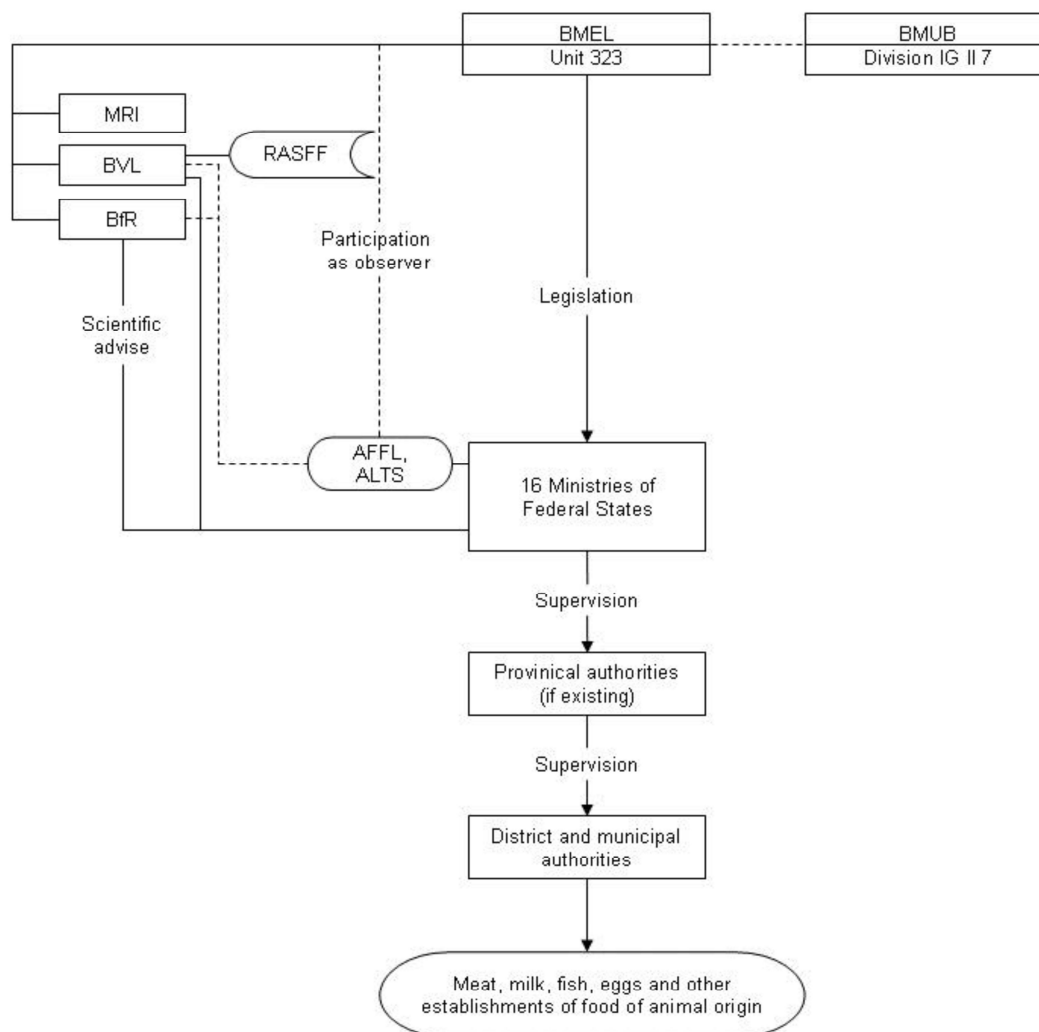
²² ここで言及されている「食肉製品」及び「食肉加工品」の定義は以下の通り（規則 853/2004）。メットは「食肉製品」に該当すると考えられる。

食肉製品（Meat preparation：Fleischzubereitungen）：食品、調味料、もしくは添加物が加えられている、あるいは手が加えられているもの。生肉の形跡が確認できるもの。

食肉加工品（Meat products：Fleischerzeugnisse）：肉を原材料とする加工食品。生肉の形跡が確認できないもの。

²³ 工藤春代「ドイツにおける食品安全コントロールシステムー日本の課題に照らしてー」フードシステム研究第 19 巻 2 号（2012）」

図表 3-12 ドイツにおける動物由来食品の監視体制



(出典) FVO Country Profile Organisation of Official Controls—Germany

企業や事業所に対する監視活動については、連邦レベルで統一的な枠組みが規定されている（食品法・ワイン法およびタバコ法の規定の遵守に関する公的監視の原則と実施に関する一般管理規定（AVV RÜb）²⁴）。上記規定の付属書²⁵に企業や事業所への立入検査の頻度を決定する算定方法が示されており、「I 企業の種類（製品の取り扱い・製品のリスク）」「II 企業の様子（法令遵守・トレーサビリティ・従業員訓練）」「III 自己検査システムの信頼性（HACCP、製品の検査、温度（冷却）の遵守）」「IV 衛生管理（建築上の基準・洗浄と消毒・従業員の衛生・生産衛生・害虫駆除）」の4つの基準に基づいて算出したスコアに従って9つのリスククラスに分類され、監視頻度が決定される。各州はこの算定方法の結果に基づき、企業や事業所への立入検査を実施している。

²⁴ Allgemeine Verwaltungsvorschrift über Grundsätze zur Durchführung der amtlichen Überwachung der Einhaltung lebensmittelrechtlicher, weinrechtlicher, futtermittelrechtlicher und tabakrechtlicher Vorschriften
http://www.verwaltungsvorschriften-im-internet.de/bsvwvbund_03062008_3158100140002.htm

²⁵ Beispielmodell zur risikoorientierten Beurteilung von Betrieben
<http://www.verwaltungsvorschriften-im-internet.de/pdf/BMELV-315-20080603-KF02-A001.1.pdf>

図表 3-13 食品法・ワイン法およびタバコ法の規定の遵守に関する
公的監視の原則と実施に関する一般管理規定の構成

第1条	一般規定
第2条	公的検査の要件
第3条	施設の公的検査の原則
第4条	規制プログラム、公的標本抽出、標本検査
	§8 公的標本抽出および標本検査の原則
	§9 公的標本抽出の実施
	§9a 食品における公的標本抽出の実施に関するその他の要件
	§10 多年度国内規制計画
	§11 全国的監視
	§11a 飼料の規制プログラム
	§11b 食品における残農薬の国内規制プログラム
	§11c 飼料における残農薬の国内規制プログラム
	§12 公的ではない検査研究室への委託
第5条	欧州委員会による規制（共同体規制）
第6条	食品法、飼料法、ワイン法およびタバコ法の規定実施のための公的対策
第7条	その他の情報交換、刊行およびレポート作成の手続
第8条	危機管理
第9条	発効、失効

図表 3-14 立入検査の頻度を決定するための企業に対する評価基準

企業		監視実施者					モニタリング頻度			
日付										
項目	評価指標	リスク					最高点	スコア	逸脱の理由	
I	企業の種類						120			
	製品の取り扱い	リスクカテゴリー								
		6	5	4	3	2				1
		0	20	40	60	80				100
	製品のリスク	リスクレベル								
		低		中		高				
0		10		20						
		アセスメントステージ								
		1	2	3	4	5				
II	企業の素行	0	3	8	9	15	15			
	食品関連法の遵守	0	1	2	3	5				
	トレーサビリティ	0		2		3				
	従業員訓練	0	2	4	6	7				
III	自己検査システムの信頼性	0	6	12	18	25	25			
	HACCP	0	3	6	9	12				
	製品検査	0	1	2	3	5				
	温度の遵守 (冷却)	0	2	4	6	8				
IV	衛生管理	0	10	20	27	40	40			
	建築上の基準	0	1	2	3	5				
	洗浄・消毒	0	2	4	6	8				
	従業員の衛生	0	3	5	8	11				
	製品の衛生	0	4	7	10	13				
	害虫の駆除	0		2		3				
合計点										

(出典) Beispielmodell zur risikoorientierten Beurteilung von Betrieben を基に、

(株) 三菱総合研究所が訳出

図表 3-15 リスククラスと監視頻度の関係

リスク クラス	合計点数	監視頻度
1	200-181	毎日
2	180-161	週1回
3	160-141	月1回
4	140-121	3ヶ月に1回
5	120-101	半年に1回
6	100-81	年に1回
7	80-61	1.5年に1回
8	60-41	2年に1回
9	40-0	3年に1回

(出典)「食品法・ワイン法およびタバコ法の規定の遵守に関する公的監視の原則と実施に関する一般管理規定」を基に、(株)三菱総合研究所が訳出

一方、食品中の有害物質（微生物、残留物質、汚染物質等）を分析するためのサンプリング方法に関しては、連邦で統一的な規定はなく、州ごとに方法が異なる。その方法は、製品ごとにサンプル数を決定する方法と企業ごとにサンプル数を決定する方法に大別される。また、これら州が実施するモニタリングプランの他、連邦と州が共同で実施する食品モニタリングプログラムがあり、後者はマーケットバスケット方式に基づくモニタリングと関心や問題のある領域に重点を置いたプロジェクトモニタリングの2つのパートからなっている²⁶。

(3) ニーダーザクセン州における食品安全施策

メットを製造販売している Rügenwalder Mühle 社（後述）の所在地であるニーダーザクセン州では、EC 規則 852/2004、853/2004、854/2004、882/2004 に基づき、食品製造加工企業や事業所への立入検査を実施している。ニーダーザクセン州には49の規制当局があり、施設及び自主検査システム全般を対象とした検査を実施している。なお、立入検査は通常事前連絡なしに行われ、その頻度については過去の検査結果や個々の食品のリスクを踏まえて決定される²⁷。

²⁶ FVO Country Profile Organisation of Official Controls—Germany、工藤春代「ドイツにおける食品安全コントロールシステム—日本の課題に照らして—」フードシステム研究第19巻2号（2012）」

²⁷ Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) Lebensmittelüberwachung
http://www.laves.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=20057&article_id=73343&psmand=23

図表 3-16 ニーダーザクセン州における立入検査項目

- ・新築物および改築物
- ・飲料水の無害性および品質
- ・温度記録（記録器具のモニタリングを含む）
- ・器具、機械、設備および空間のメンテナンス計画
- ・精肉業：動物愛護
- ・施設の清掃および消毒
- ・従業員衛生
- ・害虫対策（モニタリング／リスク低減策／駆除）
- ・動物性副産物の処理
- ・出入荷目録／トレーサビリティ
- ・検収／原料仕訳書
- ・出荷検査／製品仕訳書
- ・HACCP システム
- ・自主検査：食品微生物検査
 - 最終製品（可能であれば中間製品）に対するサンプリングプラン（規則(EC) No 852/2004 および規則(EC) No 2073/2005²⁸に基づく）
- ・危機管理システム
- ・返品

（出典）Ablauf der Betriebskontrolle im Zulassungsverfahren を基に、（株）三菱総合研究所が訳出

また、同州においても EC 規則 853/2004 に基づきと畜場、食肉加工施設に対する認可を実施している²⁹。2012 年 12 月 20 日時点の食肉関連の認可施設数は 793 となっている³⁰。

認可にあたって提出を求める申請書では、各食品カテゴリ共通の申請様式の外、食品カテゴリ別の様式が用意されている。なお、後者のうち「食肉」カテゴリの申請書様式には 1 週間当たりの食肉製品取扱量（kg）を記載する欄があり、そこにローヴルスト（Rohwurst）の項目も設けられている。

²⁸ REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs
付属文書 I 第 3 章「サンプリング及びサンプル準備に関する規則」が示されており、その 3.2 項「と畜場、ひき肉及び食肉製品製造施設における微生物学的サンプリング」において具体的な要件が示されている。

²⁹ Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)
Zulassung von Betrieben, die Lebensmittel tierischer Herkunft be- und/ oder verarbeiten
http://www.laves.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=20121&article_id=73596&psmand=23

³⁰ 2010 年 5 月 30 日時点のデータでは、「食肉」カテゴリがさらに「と畜場」「解体施設」「食肉加工施設」の 3 つに区別されており、それぞれ認可施設数は 387、206、327 であった。

図表 3-17 「食肉」カテゴリに含まれる施設の申請書様式（一部抜粋）

1.4 Bereich Herstellung von Fleischerzeugnissen:

Verwendetes Ausgangsmaterial

Schweinefleisch	☐
Rindfleisch	☐
Geflügelfleisch	☐
Wildfleisch	☐
Eier und Eiprodukte	☐
Milcherzeugnisse	☐
Fischereierzeugnisse	☐
Pflanzliche Lebensmittel	☐
_____	☐
_____	☐

Beantragte Menge an Fleischerzeugnissen in kg pro Woche

Rohwurst	
Rohpökelfleisch	
Kochpökelfleisch	
Brühwurst	
Kochwurst	

1.5 Bereich Sammlung von rohen Schlachtfetten:

Beantragte Menge in kg pro Woche: _____

1.6 Bereich Herstellung von sonstigen Erzeugnissen:

Beantragte Menge an sonstigen Erzeugnissen pro Woche

Ausgeschmolzene tierische Fette und Grieben	
Gesalzene Mägen, Blasen, Därme	
Erhitzte Mägen, Blasen, Därme	
Getrocknete Mägen, Blasen, Därme	

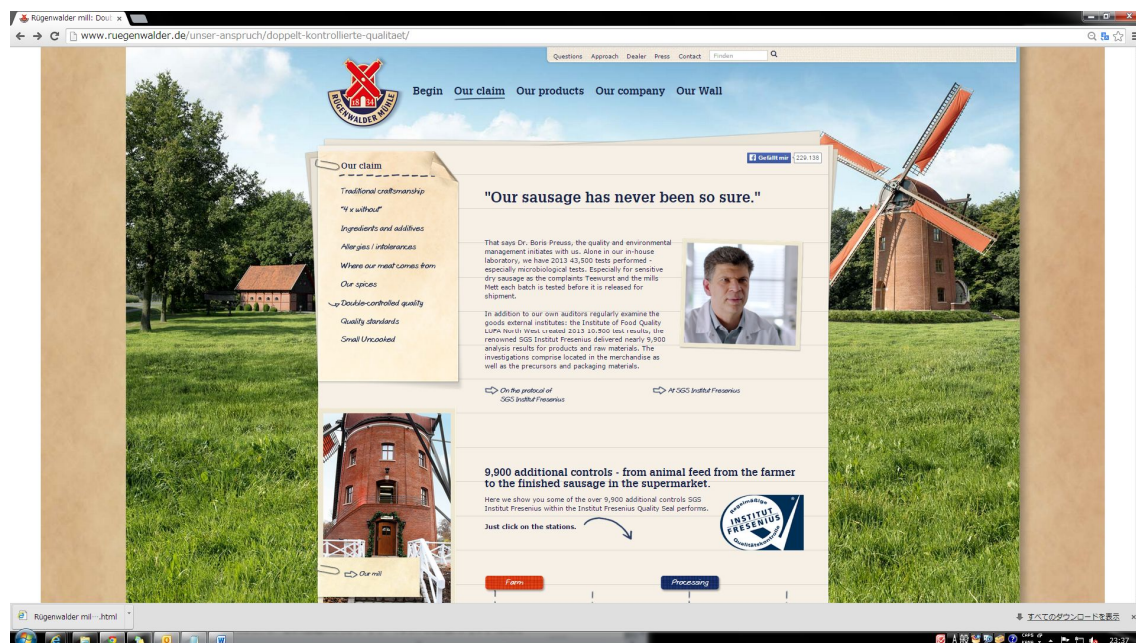
(出典) Beiblatt Fleisch zum Betriebsspiegel

3.2.3 製造販売業者の自主規制

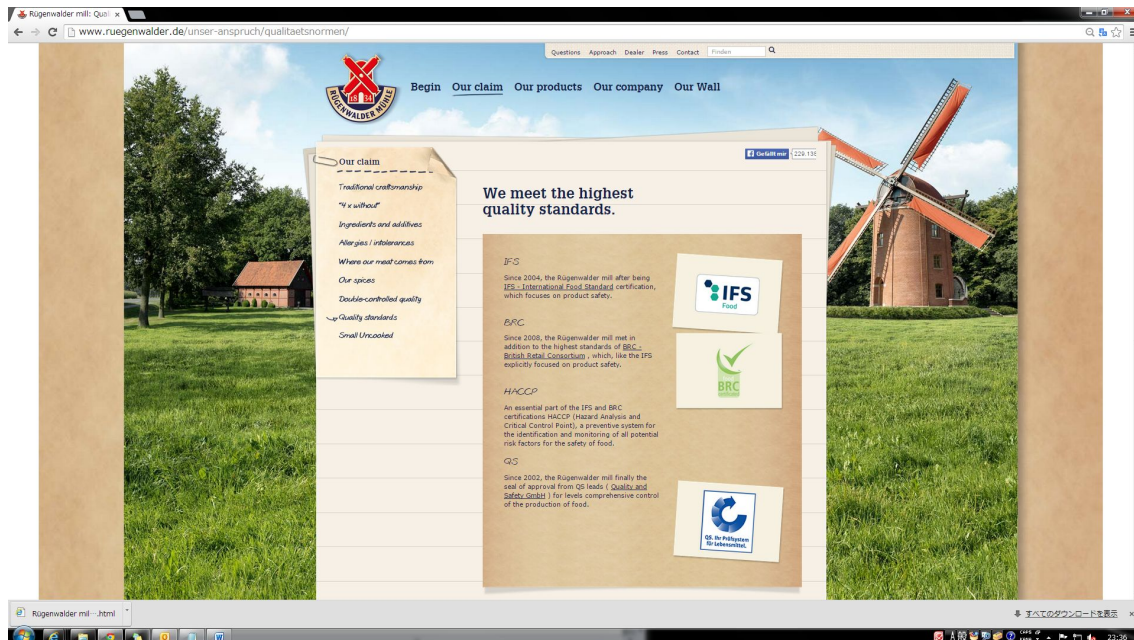
以上の行政による監視・モニタリングの他、メット由来の食中毒対策としては、メットを製造販売している事業者による自主規制がある。具体的には、自主検査を実施する、認証農場由来の豚肉のみを使用するなどの取組みが挙げられる。

メットを製造販売している Rügenwalder Mühle 社（ニーダーザクセン州、2013 年売上約 1.6 億ユーロ、従業員数 438 名）は、HP 上で自社製品の高い品質管理を謳っている。具体的には、製品安全にフォーカスした認証である IFS（International Food Standard）を 2004 年に取得したほか、2008 年にはさらに厳しい基準が求められる BRC（British Retail Consortium）を取得している。なお、衛生管理については、両認証取得の要件である HACCP 手法により実施している。その他、2002 年には食品製造の包括的コントロールレベルに対する QS（Quality and Safety GmbH）マークを取得している。同社は自社の研究所において自主的な微生物検査を実施（2013 年実績で 43,500 件）しており、特にメット等の生ソーセージについては、バッチごとに出荷前の検査を実施している。さらに、外部監査機関（the Institute of Food Quality LUFA North West および SGS Institut Fresenius）にも検査を依頼し、自社製品の品質を証明している。

また、Wilhelmbrandenburg 社および Gmyrek 社も QS (quality and safety) and IFS (International Food Standard) を取得しており、ドイツのメット製造販売事業者の品質・衛生管理に対する意識は高いものと推察される。



（出典）Rügenwalder Mühle 社 HP（英語翻訳）



(出典) Rügenwalder Mühle 社 HP (英語翻訳)

また、3.2.2 節(2)で触れた、「必ずパッケージに『よく火を通してお召し上がりください (Vor dem Verzehr durcherhitzen!)』の一例としては、下記の掲載イメージがある。下記画像はドイツの amazon 社サイトにおけるメットブルストの販売製品であるが、動物由来食品衛生規則 (Tier LMHV) で指定された表現が明記されている。



Frische Italienische Salsiccia Classic
von **EMMEDUE**
[Geben Sie die erste Bewertung für diesen Artikel ab](#)

Preis: **EUR 3,99** (EUR 11,40 / kg)
Alle Preisangaben inkl. MwSt.

Auf Lager.
Verkauf und Versand durch [GenussweltEuropa](#). Für weitere Informationen, Impressum, AGB und Widerrufsrecht klicken Sie bitte auf den Verkäufernamen.

- Frische Italienische Salsiccia Classic
- Schweinefleisch (95,84%), Salz, Aroma, Gewürze, Antioxidationsmittel: Natriumascorbat, Säureregulator: Natriumcitrat, Konservierungsstoffe: Natriumnitrit, Kaliumnitrat
- Unter Schutzatmosphäre verpackt. Gluten- und laktosefrei.**
- Grobe Bratwurst nach Art einer frischen Mettwurst. Vor dem Verzehr durcherhitzen!**

[Weitere Produktdetails](#)

EUR 3,99 + EUR 4,90 Versandkosten
Auf Lager. Verkauft von **GenussweltEuropa**
Menge:

[In den Einkaufswagen](#)

[1-Click-Bestellungen aktivieren](#)

[Auf meinen Wunschzettel](#)

[Empfehlen](#)

(出典: <http://www.amazon.de/EMMEDUE-Frische-Italienische-Salsiccia-Classic/dp/B00LEMAMPO>)

<参考情報>

A) ドイツ在住者に対するヒアリング結果

○ドイツ国内におけるメットに対する規制等について

- ・ メット等の生肉については、妊婦や小さな子供、免疫力が低下している人は食べないようにとの勧告がBfR³¹から出されている。
- ・ サルモネラ菌等のバクテリアの影響を緩和するため、亜硝酸塩や乳酸菌を混入させることが多い³²。ただし基本的に新鮮な状態で食べるので、乳酸菌の効果が十分に発揮できていないこともある。
- ・ 一部情報によると「賞味期限ではなく消費期限の表示があり、期限を過ぎたら絶対に食べないこと、リスクが高いことなどの表示がある」とのことであったが、実際に複数のスーパーマーケットで売られているメットにはそのような表示は見られなかった。

○メット等の販売状況について

- ・ メットをはじめとした瓶詰の生肉系食品は一般的なスーパーマーケット等において販売されており、販売場所の制限はない。
- ・ 多くのドイツ人は肉をスーパーマーケットだけでなく肉屋でも購入する。肉屋で販売されているメット等には特に注意書きなどはない。

○一般消費者の生食に対する認識について

- ・ 食肉の生食に伴う危険性（妊婦や小さな子供、免疫力が低下している人に対する健康危害リスク等）に関する知識については、一般消費者にはあまり知られていないと思われる。

³¹ Federal Institute for Risk Assessment: Seasoned minced meat and raw minced pork are not for little children! 11/2012, 12.03.2012

http://www.bfr.bund.de/en/press_information/2012/11/seasoned_minced_meat_and_raw_minced_pork_are_not_for_little_children_-129197.html

³² Rügenwalder Mühlen 社で製造販売されている3種類のメットには乳酸菌が添加されている。

<http://www.ruegenwalder.de/unsere-produkte/muehlen-mett/schinken-zwiebelmettwurst/>

<http://www.ruegenwalder.de/unsere-produkte/muehlen-mett/zwiebelmettwurst/>

<http://www.ruegenwalder.de/unsere-produkte/muehlen-mett/jaeger-art/>

B) ドイツ国内におけるメットの流通・消費量

図表 ドイツ国内におけるソーセージ生産量

	2012	2013
ソーセージ		
生産量 (t)	1,474.449	1,458.670
生産額 (1,000€)	6,866.158	7,029.197
価格 (€/kg)	4,66	4,82
うちローヴルスト		
生産量 (t)	439.612	433.669
生産額 (1,000€)	2,434.974	2,469.358
価格 (€/kg)	5,54	5,69
うちブリュヴルスト		
生産量 (t)	869.023	853.054
生産額 (1,000€)	3,639.870	3,708.528
価格 (€/kg)	4,19	4,35
うちコッホヴルスト		
生産量 (t)	165.814	171.947
生産額 (1,000€)	791.314	851.311
価格 (€/kg)	4,77	4,95

(出典) Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V. (BVDF) 資料³³に基づき、
(株) 三菱総合研究所が作成

C) メットに関連した食中毒アウトブレイク

(昨年度報告書より抜粋)

- ・ ドイツでは 2005 年より BELA システム (federal system for collecting data in food involved in disease outbreaks) ³⁴を導入し、食中毒のアウトブレイクに関するデータを収集、記録している。
- ・ BELA システムは連邦リスク評価機関 (Federal Institute for Risk Assessment: BfR³⁵) により運用されている。
- ・ 収集したデータは定量的リスク評価を行うために活用される。原因食品や疫学的な関連性を特定する他、新たな病原体や食品、喫食パターンに関連した新たなリスクを特定するために用いられる。
- ・ 2 人以上が同じ食品により食中毒を発症した場合にアウトブレイクが疑われる。一般行政規則 (AVV) 「フードチェーンにおける人獣共通感染症」に基づき、各州の規制当局は全てのアウトブレイク事例について調査を実施し、食品のモニタリングを実施する責任がある。食中毒に関するデータは BELA1 reporting system で BfR に報告される。
- ・ 生肉及び生肉料理の喫食に起因する食中毒についても、「食肉、食肉製品、及びソーセ

³³ Geschäftsbericht 2013/2014

file:///C:/Users/2090205.MRI-IS/Downloads/geschaeftsbericht_2013-2014_presse_download.pdf

³⁴ BELA システムの詳細 (ドイツ語のみ)

http://www.bfr.bund.de/de/bundeseinheitliches_system_zur_erfassung_von_daten_zu_lebensmitteln_die_bei_krankheitsausbruechen_beteiligt_sind_bela_-70495.html

³⁵ BfR の詳細 http://www.bfr.bund.de/en/foodborne_disease_outbreaks-53818.html.

ージ」というカテゴリで BfR によるデータの収集、評価が行われている。

BfR によって明らかに生肉の喫食に由来すると評価された食中毒事例は以下の通り。

年次	食中毒事例
2007	・塩漬け及び燻製豚肉製品による <i>Cl. Botulinum</i> ・塩漬け及び燻製鶏肉製品による <i>S. Bovismorbificans</i> ・塩漬け及び燻製豚肉製品及び生ソーセージによる <i>Trichinella</i> spp. ・味付けされた豚ひき肉による <i>Sarcocystis</i> spp. (?)
2008	・生卵を添えた味付け豚ひき肉（生食）による <i>Salmonella</i> Enteritidis ・一部に生卵が混ぜられたソーセージ肉(生食)による <i>Salmonella</i> Enteritidis (2 例) ・生豚ひき肉で作られた味付け生ソーセージによる <i>S. Bovismorbificans</i> ・塩漬け及び燻製豚肉製品による <i>Cl. Botulinum</i>
2009	・一部に生卵が混ぜられた味付け豚ひき肉（生食）による <i>Salmonella</i> spp. (少なくとも 3 例) ・生ソーセージ（乾燥、イタリアからの輸入品？）による <i>Salmonella</i> spp.
2010	・事例なし
2011	・一部に生卵が混ぜられた味付け豚ひき肉（生食）による <i>Salmonella</i> Enteritidis（原因菌は卵から検出） ・味付け豚ひき肉による <i>Salmonella</i> Typhimurium (2 例) ・生豚ひき肉で作られた味付け生ソーセージによる <i>Campylobacter coli</i>
2012	・味付け豚肉及び生豚ひき肉で作られた生ソーセージによる <i>Salmonella</i> Panama（複数の地域にまたがるアウトブレイク。と畜場の汚染豚が原因。） ・生卵を混ぜた豚ひき肉による <i>Salmonella</i> Enteritidis（原因菌は卵から検出） ・味付け豚ひき肉による <i>Salmonella</i> Typhimurium (3 例) ・味付け豚ひき肉による <i>Campylobacter jejuni</i> ・味付け豚ひき肉による <i>Norovirus</i> ・鴨の生胸肉（生食）による <i>Campylobacter</i> spp.（不確定）

（出典）在日ドイツ大使館によるヒアリング情報に基づき、(株)三菱総合研究所作成

海外の食肉や内臓肉の生食実態に関する基礎的情報の収集支
援業務（その２） 報告書

2015 年 1 月

株式会社 三菱総合研究所
人間・生活研究本部

研究成果の刊行に関する一覧表

総説等

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
等々力節子, 川崎晋	放射線殺菌	食品衛生学雑誌	55	J215-218	2014

講演

発表者氏名	演題名	発表学会名	発表時期
等々力節子	放射線殺菌	第 107 回日本食品衛生学会学術講演会シンポジウム	2014年 5月