

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 27 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 28 (2016)年 3 月

## 目次

． 平成 27 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	
． 分担・協力報告書	
1． 畜産食品が原因の寄生虫性食中毒に関する研究：	
牛肉中の食中毒危害性住肉孢子虫汚染調査	19
鎌田 洋一、三井 太平	
3． 牛肝臓内の大腸菌の分布とその殺菌法の検討	33
山崎 伸二、日根野谷 淳	
4． 放射線照射による微生物除去	41
等々力 節子、川崎 晋	
5． 高圧処理による鶏ササミ中の食中毒原因菌の不活化に関する検討	55
岡田 由美子、吉田 麻利江、鈴木 穂高、荻原 博和	
6． 高圧処理による牛肝臓の超微細形態学的変化に関する検討	65
鈴木 穂高、道下 正貴、畠山 仁、荻原 博和、岡田 由美子	

平成 27 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

日本国内では近年、畜産食品の生食による健康被害が報告され、生食用牛肉の加工基準の設定、牛肝臓、豚肉等の生食用提供の禁止等の措置が取られてきた。本研究では平成 25 年より、畜産食品の生食リスクを明らかにし、その低減の可能性を検討することを目的として、研究を実施した。

本年度は、畜産食品の汚染実態として、牛 6 頭の肉及び内臓における住肉胞子虫の分布状況の調査を行った。その結果、心筋 6 検体 (100%)、ヒレ 5 検体 (83.3%) 等から住肉胞子虫のシストが検出された。また、厚生労働省が通知した馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査の方法が、牛検体においても応用可能であったが、顕微鏡による検査法の結果とのかい離もみられ、試験法の改善が必要と思われた。

牛肝臓表面及びその内部、胆汁及び肛門組織における志賀毒素遺伝子の検出を行ったところ、肝臓表面から *stx2* 遺伝子が検出されたが、胆汁及び肝臓内部からは *stx* 遺伝子は検出されなかった。

低減手法の検討は、消毒薬及び放射線照射による牛肝臓中の殺菌法と、高圧処理による鶏ササミ中の殺菌法について検討した。消毒薬を用いた殺菌法の検討では、牛の肝臓内に存在する大腸菌群及び腸内細菌科菌群を塩素系または非塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせると殺菌可能か、肝臓を 5 カ所 (部位 1-5) あるいは 2 カ所 (左葉 [部位 1 と 2] と右葉 [部位 3-5]) に分けて評価した。その結果、殺菌効果は消毒薬の種類によってかなり差があることが示された。

放射線照射による検討では、放射線抵抗性が高いことが確認された *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を牛肝臓内部に接種してガンマ線照射を行い、 $D_{10}$  値として、凍結 (-80 ) 含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy を得た。また、*Salmonella* を  $10^5$  CFU/g 接種した検体について、目標線量が、6、7、8 kGy となるよう 3 段階の線量のガンマ線を照射した場合、含気条件では 7 kGy、脱気条件では 8 kGy で *Salmonella* が非検出となった (n=5)。抽出法を変更して回収率を向上させた分析法により、氷冷 (0 ) 6 kGy、凍結 (-80 ) 10 kGy までの牛肝臓のガンマ線照射における、2-アルキルシクロブタノン類 (2-ACBs)、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB の生成量を再確認した。

高圧処理による検討では、300MPa 5 分間の処理を 6 回反復する処理により、鶏ササミに接種した *S. Typhimurium* LT2 株が 2 ~ 5log の低減を示し、*Campylobacter jejuni*

NCTC11168 株では 7log 以上が低減して、定量法では検出限界以下となった。今回の処理条件により、肉色は白化する傾向を示した。サルモネラでは高圧処理後の発育集落数が選択分離培地と非選択培地上で異なっている場合が見られ、処理により損傷菌が発生していると思われた。また、高圧処理を行った牛肝臓の超微細形態学的変化について検討したところ、細胞質のミトコンドリア内部に球状の無構造な凝集物の蓄積や、核の周囲に存在する粗面小胞体の不明瞭化などの変化が認められた。このような変化は処理圧が高くなるほど顕著となった。これらの超微細形態学的変化は高圧処理による牛肝臓の硬さの変化と関連していると考えられた。

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

研究協力者：

川崎 晋 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

三井 太平 岩手県食肉衛生検査所

鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所

吉田 麻利江 国立医薬品食品衛生研究所

道下 正貴 日本獣医生命科学大学

畠山 仁 日本獣医生命科学大学

#### 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、牛肝臓の生食用提供禁止及び豚肉（及びその内臓）の生食用提供の禁止という行政措置が実施された。一方で、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、国内での牛の肝臓各部位等における志賀毒素遺伝子の分布調査、牛肉中の寄生虫汚染実態に関する調査を行った。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、消毒薬、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) 牛肉中の食中毒危害性住肉胞子虫汚染調査

(1)- 1. 牛肉における住肉胞子虫検査

平成 25 年 11 月に病畜として搬入されたメスのホルスタイン種 (44 ~ 101 か月齢) のウシ 6 頭からそれぞれ筋肉 8 ~ 9 ヶ所計 52 ヶ所を採材した。採取部位は、心筋、横隔膜筋、咬筋、ネック、カタ、リブローズ、ヒレ、モモ、舌を選出した。住肉胞子虫検出は、1 検体あたり 2×2×2 cm のブロックを切り出し、10% 中性ホルマリン緩衝液で固定したのち、筋肉の走行に垂直に切り出し、常法に従って HE 染色を施し、切片 1×1 cm 中の住肉胞子虫シストを計数した。また、厚生労働省が

通知した馬肉中の住肉孢子虫遺伝子検査法を参照し、採材した肉検体から 0.3 g を取り出し、ミンチ状とした懸濁液の上清から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出精製して、住肉孢子虫 18S rRNA 遺伝子を標的とする PCR 法による試験を行った。プライマーは厚生労働省通知のものを用い、試薬は 10×Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa) を用いた。PCR 産物は研究室保有の *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子増幅断片を陽性コントロールとして、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。約 1,100 bp の遺伝子増幅産物が確認されたものを陽性とした。

#### (1) - 2 住肉孢子虫毒性タンパク質の検出

*S. fayeri* が持つ下痢誘発毒性タンパク質に対する抗体を用いて、検査筋肉中のシストの、免疫学的交差性のある毒性物の存在を検証した。同抗体は、国立医薬品食品衛生研究所でウサギを用いて作成されたポリクローナル抗体で、*S. fayeri* 虫体から分離された 15kDa タンパク質への抗体を示している。

上記のパラフィン切片について、脱パラフィンし、抗毒性タンパク質抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Sigma)、および発色剤としてペルオキシダーゼ染色 DAB キット Brown Stain (ナカライテスク) の順で反応させた。封入後、光学顕微鏡下で、陽性の指標として褐色反応があるかどうか確認した。

#### (2) 肝臓内部、表面、胆汁と肛門組織からの *stx* 遺伝子の検出

肝臓を 5 つの部位、すなわち生食用として提供されていた部位 1 と 2、加熱用として提供されていた部位 3 から 5 に分け、それぞれの部位から検体を採取し、TSB で増菌培養後、*stx1* と *stx2* を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法で *stx* 遺伝子を検出した。尚、2015 年 1 月から 3 月までは、50 g の肝臓を、4 月から 9 月までは 100 g の肝臓を取り出し、それぞれ等量の PBS を加え、ストマック処理を行なった後、1 mL を 1.25 x TSB、4 mL に加え 37°C で一晩増菌培養した。2015 年 10 月から 12 月までの検体は、50 g の肝臓に 50 mL の TSB を加えストマック処理を行った。その後、TSB で総量 250 mL となるようにメスアップし、37°C で一晩増菌培養した。それぞれの増菌培養液 1 mL を回収し、遠心分離後上清を捨てペレットに 1 mL の TE を加え、100°C、10 分間加熱処理した。遠心分離後、上清を回収し鋳型 DNA として PCR に供した。

#### (3) 牛肝臓内の大腸菌群の菌数と各種消毒薬の殺菌効果の比較

##### (3) - 1 . 肝臓を 5 つの部位に分けた場合

屠畜解体直後に牛肝臓と胆汁を採取し、肝臓については、塩素系消毒薬 (A と E) と抗菌活性確認されている非塩素系消毒薬 (B、C、D) を胆管内に注入し肝臓内を洗浄、殺菌した。その後、肝臓を 5 つの部位、すなわち生食用として提供されていた部位 1 と 2、加熱用として提供されていた部位 3 から 5 に分け、それぞれ

の部位から約 50 g (2015 年 1 月より 3 月まで) あるいは約 100 g (2015 年 4 月より 9 月まで) を採取し、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。ストマッカー処理した肝臓検体と胆汁をそれぞれ滅菌 PBS で段階希釈し、得られた 100  $\mu$ L を MacConkey 寒天培地に植菌し、大腸菌群の菌数を測定した。そのうち部位 1 と 2 は、さらに 25 g の肝臓を採取し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結融解後、同様の処理を行い、大腸菌群の菌数を測定した。さらに、BPW 培地で増菌した培養液を VRBG 寒天培地に植菌し  $37^{\circ}\text{C}$  で一晩培養した。コロニーが得られなかった場合、さらに、EE 培地で増菌培養を行い VRBG 寒天培地に植菌し  $37^{\circ}\text{C}$  で一晩培養後、腸内細菌科菌群の有無を判定した。

#### (3) - 2 . 肝臓を左葉、右葉で分けた場合

2015 年 10 月より、肝臓を部位 1 と 2 に該当する左葉と部位 3-5 に該当する右葉に分け、それぞれ 10 カ所から 5 g、合計 50 g を採取して上記と同様に処置した。さらに、10 カ所から 2.5 g ずつ採取し合計 25 g を  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結融解後、上記と同様に処置した。

#### (4) 放射線照射による微生物除去

##### (4) - 1 . 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は 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、 $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

2-ACBs 定量用の牛肝臓試料は、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( $0^{\circ}\text{C}$ )照射では氷中に 3 時間、凍結( $-80^{\circ}\text{C}$ )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。

##### (4) - 2 . 供試菌株

*Salmonella* Enteritidis IFO3313 株は Trypticase Soy Broth (TSB; Difco) にて 35 一昼夜静置培養した後、リン酸緩衝溶液に再懸濁し、 $10^9$  CFU/mL となるように調整して試験に用いた。

##### (4) - 3 . ガンマ線照射

ガンマ線照射には、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( $0^{\circ}\text{C}$ ) および冷凍(ドライアイス下) ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) の 2 条件を設定した。線量率は約 2.97 kGy/h であった。

正確な吸収線量は模擬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) - 4 . 牛肝臓のガンマ線殺菌効果確認試験

25g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、終濃度で  $10^8$  CFU/g 程度 (生残曲線作成用) あるいは  $10^5$  CFU/g 程度 (殺菌効果確認用) となるように調製した供試菌液 100 $\mu$ L を注入することで行った。菌体接種後の試料は、直ちにガスバリア袋

を用いて含気あるいは真空包装を行った。包装後の検体は、-80 の冷凍庫内で2時間以上放置して温度を一定にした後、ガンマ線照射に供した。

生残曲線を作成するための試料は、目標線量として、冷凍下で 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 kGy の線量を照射した。また、殺菌効果確認用の試料は、冷凍条件下で、目標線量、6、7、8 kGy の3段階の線量を照射した。

照射後の検体は、解凍後直ちに菌数計測した。

#### (4) - 5 . 生菌数測定および標的微生物の検出

ガンマ線照射後の検体に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VRBG平板 (Oxoid)にスパイラルプレーティング法で塗抹した。これらの平板は35 で各々24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 *Salmonella* 数を求めた。さらにVRBG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、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

殺菌線量を求める実験では、目標線量 (6、7、8 kGy)を照射した後、検体に滅菌緩衝ペプトン水を加えて10倍乳剤とした後、35 で一昼夜培養した。培養した菌液は標準寒天平板およびVRBG平板 (Oxoid)に一白金耳を画線し、35 で一昼夜培養した。出現した集落は、それぞれ釣菌し、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

#### (4) - 6 . 2-アルキルシクロブタノン分析

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 を加えて分液口途中で混和し、4 の冷蔵庫中で1晩放置後、クロロホルム層を集めた。この抽出物の溶媒を留去後、アセトニトリル 2mL に再溶解させた。これを2回繰り返して、アセトニトリル溶液を合わせ、-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、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 Silica gel 60 70-230 mesh) 2本に添加し、10 mL のヘキサンで洗浄後、ヘキサン/ジエチルエーテル (98:2) 15 mL で溶出し、その 5-15mL 画分を集めた<sup>2)</sup>。この試料を濃縮して、内部標準物質として、2-cyclohexylcyclohexanone、0.05 µg / mL を含むヘキサン 200 µL に溶解した。この試料を 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。なお、検量線は、2-ACBs の標準試料に、非照射の牛肝臓か

らの抽出精製物を添加したマトリックススタンダードを用いて作成した。

#### < GC-MS 条件 >

GC 装置: GC : GC-2101,  
検出器 : MS : QP2010+ Shimadzu 200  
カラム : DB-5MS(60m×0.25mm 0.25 $\mu$ m) カラム温度: 55 (2min)→20 /min→175 , 2 /min→250 , 10 /min→270 (20min)  
注入口 250  
注入モード: パルスドスプリットレス  
注入サンプル量 1 L  
モード: EI (70eV) SIM 測定  
定量イオン: m/z = 98  
確認イオン: m/z = 112

#### (4) - 7 . 電子線照射に関する予備試験

(株)原子燃料工業 NFI 照射サービスに委託し、同社が保有する電子加速装置 Rhodotron (10 MeV 200 kW, IBA 社製)を用いて実施した。

10 MeV 電子の深部線量分布 (depth-dose)を確認するため、比重約 1 g/cm<sup>3</sup>、厚さ約 20 mm の板状こんにゃくを模擬試料とし、4 枚重ねにしたこんにゃくに斜めに切り込みを入れ、テープ状の CTA フィルム線量計 (FTR-125 富士フィルム社製)をはさみ、10 MeV、12 mA の電子を照射した。片面照射時の試料厚さは 86.4mm コンベア速度は、5.71 m/min, 両面照射時の試料厚さは 81.5 mm コンベア速度は、7.61 m/min であった。CTA フィルムの 280 nm における吸

光度から、試料表面からの深さ方向における吸収線量 (kGy) を算定した。

殺菌効果の予備試験としては、25g の肝臓試料に 10<sup>5</sup> CFU/g となるように *Salmonella* を接種し、ガスバリア袋で包装して凍結 (-80 )した試料を、発泡スチロール製の箱に入れたドライアイスの上に重ならないように並べ、両面から 10 MeV、4 mA の電子で両面照射した。コンベア速度は、目標線量 6、7、8 kGy に対し、それぞれ、13.68、11.73、10.26 kGy/m とした。肝臓試料の照射方向に対する厚みは、10~15 mm 程度であった。照射条件ごとに、ラジオクロミックフィルム線量計 (FWT-60) を試料表面に装着した常温の肝臓試料を同時に照射し、吸収線量の確を行った。

#### (5) 高圧処理による鶏ササミ中の食中毒原因菌の不活化

供試菌株には、*Salmonella* Typhimurium LT2 株と *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 株を用いた。

高圧処理を行う食品検体は、市販の鶏ささみ肉を用いた。接種試験用の検体は 10g 片に切断し、菌液を接種して高圧処理用袋に二重に密封した。硬度及び色彩を測定する検体と病理組織学的検索に用いる検体は、細切せずに 1 本のまま処理した。高圧処理は TSF6-50 (東洋高圧)を用いて 300MPa、5 分を 6 回反復する条件で行った。

カンピロバクターに対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を 4 倍量の MH 液体培地中で 5 倍乳剤を作成し、各 100 $\mu$ l を MH 寒天平板及び CCDA 寒天平板に

塗布後、MH 培地は 37℃、CCDA 培地は 42℃ にてアネロパック及び嫌気ジャーを用いた微好気培養を行い、48 時間後に定型集落の計数を行った(定量試験)。また、一部検体を Bolton 培地で処理し、37℃ で 4 時間、41.5℃ で 44 時間微好気培養後に CCDA 培地に塗布し、42℃ 48 時間培養後に定型集落の確認を行った(定性試験)。サルモネラ属菌では、高圧処理後の検体を 4 倍量の滅菌生理食塩水中でストマツカー処理して 5 倍乳剤を作成し、各 100 $\mu$ l を BHI 寒天平板及び CHROMagarSalmonella 平板に塗布後、37℃ で好気培養を行い、48 時間後に定型集落の計数を行った(定量試験)。また、5 倍乳剤の残りは 37℃ で 18 時間前増菌培養後、RV 培地に接種して 42℃ 22 時間増菌培養ののち、CHROMagarSalmonella 平板に塗布する定性試験を実施した。定量試験では、平板に発育した定型集落数と希釈倍率から、高圧処理前及び処理後の検体中の菌数を算出した。

高圧処理による鶏ササミ肉の硬度及び色調の変化は、菌を接種しないササミ検体に上記の高圧処理を行って計測した。未処理、300MPa、5 分の高圧処理を 1 回、3 回及び 6 回かけた検体について、レオメーター TP - 10 (ヤマデン) を用いて硬度を、色差系 (コニカミノルタ) を用いて色調を計測した。

#### (6) 高圧処理による微細形態変化の観察

平成 25 年度の報告書にある「高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不

活化に関する検討」、ならびに「高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関する検討」と同様に行った。高圧処理後の検体については 1mm 角ほどに細切し、固定後、定法に従って電子顕微鏡による観察を行った。

#### C. 結果及び考察

##### (1) 牛肉中の住肉胞子虫

咬筋の薄切 HE 染色標本中に、*S. cruzi* と推定されるブラディゾイトを包有した住肉胞子虫のシストが観察された。

抗 *S. fayeri* 毒性タンパク質抗体を用いた住肉胞子虫シストに対する免疫組織学的検証では、住肉胞子虫のシスト内のブラディゾイドが褐色に染色された。この染色状態は、これまで報告されている馬肉や牛肉(心筋)と同一であったことから、馬に寄生する *S. fayeri* が持つ下痢誘発毒性タンパク質と免疫学的に交差する物質が、牛の住肉胞子虫にも存在すること、また、心筋だけでなく咬筋を寄生部位とする住肉胞子虫にも同タンパク質が存在する可能性が高いことを示していた。しかし、*S. cruzi* を原因とする食中毒事例はわが国では報告がなく、その病原性は不明である。今後、牛肉の住肉胞子虫の危害を分析するにはそれらの情報が必要である。

6 頭の牛の 9 部位における、住肉胞子虫のシストを計数したところ、全頭でいずれかの部位にシストが確認された。最も効率に検出された部位は心筋で(100%)、次に横隔膜筋および咬筋(83.3%)だった。9 ヲ所すべての部位からシストが検出されたのは、6 頭中 2 頭だ

った。シストの数は個体によって変動がみられたが、心筋では 1 cm<sup>2</sup> 当たりの平均シスト数が 0.1 から 3.5 であった。心筋が最もシスト数の多い部位であり、ヒレ、ネック、舌と続いた。今回の研究で、牛の咬筋あるいは、可食部の筋肉の全てから、住肉胞子虫のシストが顕微鏡下で確認された。そのシスト数には多少があり、検出されない部位もあった。しかしながら、検査を行った 6 頭すべてにおいて、共通してシストが検出されなかった部位はなく、住肉胞子虫の危害について牛体の中で例外部位はないと考えるべきと推察する。現行の住肉胞子虫を顕微鏡下で確認する方法は、筋肉片の均質化液を光学顕微鏡で観察し、遊離してくるブラディゾイトを確認するか、実体顕微鏡を用いて筋肉片からシストを摘出してシストを確認、その後シストから遊出するブラディゾイトを確認するとなっている。この方法では、ブラディゾイトを検出するのに習熟した技術を要求され、顕微鏡検査を正当に行えない危険性がある。そのため、本研究では古典的であるが、薄切切片を作製し、ヘマトキシリンに濃染するブラディゾイトの集団と、それらを取り囲むシストを光学顕微鏡下で確認する方法を採用した。牛の咬筋を観察したところ、明瞭なブラディゾイトの集団とそれらを取り囲むシストを確認し、シスト壁の構造から、検出した住肉胞子虫は *S. cruzi* と判定された。

ウシの筋肉各部位から抽出した DNA をテンプレートとして、牛肉中の住肉胞子虫遺伝子検査を実施した。住肉胞子虫遺伝子用の PCR の条件は馬肉について

検討されたものであるため、馬肉より摘出した *S. fayeri* 虫体から抽出した DNA を陽性対象とした。30 サイクルの PCR で、*S. fayeri* 由来 DNA では、約 1,100 bp のバンドを検出した。ウシのネック部、横隔膜、舌からの DNA についても、約 1,100 bp の PCR 産物が確認された。以上より、食中毒診断を目的としての馬肉中の住肉胞子虫(*S. fayeri*)を対象とした遺伝子定性検査法は、副次的なバンドも多少あるものの、検査結果の評価に支障はなく、牛肉から抽出した DNA への応用が可能であることが確認された。また、結果には示していないが、PCR 産物の塩基配列を調べたところ、*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子と相同性があることが確認された。

牛肉中の住肉胞子虫検出に関する顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果の相関を検討した。顕微鏡下で陽性だった 38 検体のうち、遺伝子検査陽性だったのは 20、陰性は 18 だった。顕微鏡下でシストが確認できなかった 14 検体については、それらのうちの 7 検体から住肉胞子虫の遺伝子増幅が確認された。以上より、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果は大きくかい離していた。筋肉の薄切切片を染色し、住肉胞子虫のシストを確認する方法の信頼度は高い。シストを 1 つでも確認できれば陽性を示すことができる。しかし、同法はブロック状の筋肉組織の、数  $\mu\text{m}$  における検査である。一方、遺伝子検査においても、DNA を抽出するのは検体のわずか 0.3 g に過ぎない。今回調査した牛肉、および食中毒の原因となった馬肉を顕微鏡で観察すると、住肉胞子虫のシストは、

筋肉に均質に分布していなかった。一方、シストの中には、非常に多数のブラディゾイトが集合しており、住肉孢子虫の DNA は、筋肉のなかで極めて局在化している状態になっている。以上から、牛肉における住肉孢子虫の危害性を評価するには、現行の住肉孢子虫食中毒を診断する顕微鏡検査法および定性 PCR 法を改良する必要があると考える。昨年度の馬肉中の住肉孢子虫遺伝子検査法に関する検討で、定量 PCR の有用性を示した。また、DNA を抽出する検体量の増加、ならびにその均質化が検査結果のばらつきを少なくするのに有効であることを示した。*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列は、*S. fayeri* のそれと部分的に一致し、また、それぞれに固有の部分がある。それらを利用し、DNA 抽出のための牛肉の量を増やし、均質化した後に DNA を抽出すること、さらに、*S. cruzi* の 16S rRNA 遺伝子をクローニング後、その標準 DNA と検量線を用いての定量 PCR 法を構築することが推奨される。

#### (2) 肝臓内部、表面、胆汁と肛門組織からの *stx* 遺伝子の検出

0.5 g/1.0 g 相当の増菌培養液から PCR 法で *stx* 遺伝子の検出を試みたところ、88 検体の肝臓内部及び 80 検体の胆汁からは *stx* 遺伝子は検出されなかった。一方、87 検体の肝臓表面から 4 検体で *stx2* 遺伝子が検出された。最も汚染率が高い肛門組織を 81 検体調べたところ、64 検体から *stx1*、*stx2* 遺伝子のどちらか一方あるいは両方が検出された。さらに、50 g 相当となるように増菌培養した検体では、

48 検体の肝臓左葉と右葉、及び 36 検体の胆汁から *stx* 遺伝子は検出されなかった。肝臓表面からは 48 検体中 6 検体で *stx2* 遺伝子が、肛門組織からは 30 検体中 27 検体でいずれかの *stx* 遺伝子が検出された。

尚、0.5 /1.0 g 相当の増菌培養液での検出下限は 62 CFU/50 g、50 g 相当の増菌培養液での検出下限は 6.2 CFU/50 g であった。

STEC 汚染は畜産食品の生食において最も問題となるものであるが、今年度調べた限り、牛肝臓内部から *stx* 遺伝子は検出されなかった。一方、牛肝臓表面からは *stx2* 遺伝子が検出された。肛門組織においても *stx2* 遺伝子の陽性率が高いことから、おそらく、屠畜解体時に牛の糞便を介して肝臓表面を汚染したものと考えられる。いずれにせよ、さらに検体数を増やして牛肝臓内部に STEC が混入しているのか、もし、混入するとすればどのような経路でどの部位が汚染するのかについて調べて行く必要がある。

#### (3) 肝臓を 5 つの部位に分けた場合の大腸菌群の菌数と消毒薬の殺菌効果

2015 年 1 月から 9 月までの検討で、消毒薬 A を肝臓内に注入した場合、生食用として提供されていた部位 1 と 2 での陽性率は 26%と 23%と、他の消毒薬の 56-86%と比べ低かった。一方、加熱用として提供されていた部位 3-5 では、全体的に陽性率が高かった (70-100%) が、消毒薬 A では菌の陽性率は、50-60%と他の消毒薬と比較して低かった。

さらに、凍結融解を組み合わせた殺菌効果について調べた結果、凍結融解後2回増菌した場合、部位1と2とも60%で腸内細菌科菌群が検出された。一方、消毒薬B、C、Dでは凍結融解後の大腸菌群の陽性率は33-60%であったが、2次増菌後の腸内細菌科菌群の陽性率は90-100%であった。さらに、消毒薬AとEの効果をより詳細に調べることを目的に、肝臓を生食用として提供されていた部位1と2を左葉、加熱用として提供されていた部位3-5を右葉に分けて、2.5gを10カ所から採取し、腸内細菌科菌群の陽性率の低かった消毒薬Aを2つの濃度(2,000ppmと500ppm)で評価し、さらに別の塩素系消毒薬Eについても評価した。その結果、消毒薬Aが500ppmの場合、右葉では凍結無しで100%大腸菌群が陽性であったのに対し、左葉では凍結無しで44%の陽性率であった。さらに、凍結融解後は陽性率が33%まで下がったが、2次増菌を行うと陽性率が89%まで上がった。2,000ppmを用いた場合もほぼ同様の結果であった。一方、消毒薬E(400ppm)を用いた場合、凍結無、凍結融解後の陽性率はそれぞれ8%、2次増菌後の陽性率は50%であった。

昨年度までの研究で牛肝臓内の大腸菌群の分布は生食用として提供されていた部位1と2は、加熱用として提供されていた部位3から5と比べて汚染率が低く、また、胆汁の陽性率よりも肝臓内の汚染率の方が高いことが明らかとなった。その理由として、肝臓内の大腸菌群は、胆汁も汚染源の1つではあるがそれ以外にも汚染源がある可能性が考えられ、その

1つが血管(門脈、静脈)であった。本年度の研究では、種々の塩素系消毒薬と非塩素系消毒薬の肝臓内大腸菌群及び腸内細菌科菌群の殺菌効果について比較した。調べた検体数は必ずしも十分でなく、また、季節性を考慮できていない点も含め今回の結果でどの消毒薬が最も優れているか結論づけることはできないが、消毒薬の種類によって効果に違いがあった。さらに殺菌効果を上げる目的で各種消毒薬と凍結融解を組み合わせることで評価したところ、消毒薬A(2,000ppm)を用いた場合、25gの肝臓検体をBPWとEE-brothによる2次増菌培養を行った後でも部位1と2の40%で腸内細菌科菌群は全く検出されなかった。このことはロットによっては消毒薬A(2,000ppm)と凍結融解を組み合わせることによって検出される腸内細菌科菌群をゼロにできる可能性を示している。さらに詳細に調べる目的で、生食用として提供されていた部位1と2をまとめ左葉とし、加熱用として提供されていた部位3から5を右葉としてそれぞれ、2.5gを10カ所から回収し同様の実験を行った。その結果、消毒薬A(2,000ppm、500ppmとも)では凍結融解後の陽性率は下がったものの2次増菌後は約90%で腸内細菌科菌群が検出された。消毒薬Eを用いた場合は、2次増菌後の陽性率が50%と最も良い結果が得られたが、調べた肝臓における汚染菌数も元々少なかった。凍結融解後に陽性となった1検体は胆汁中に $10^7$  CFU/mlの大腸菌群が存在していたものであった。今後さらに殺菌効率を上げる為の検討、あるいは、事前に汚染菌数の高い検体を検出できる

方法を開発し、汚染菌数の少ない特定の肝臓のみ殺菌する方法の開発が求められる。

#### (4) 放射線照射による微生物除去

(4) - 1 . 凍結した牛肝臓中での *Salmonella* の殺菌効果 凍結した牛肝臓中での *Salmonella* の殺菌効果について、25 年度の実験では、*Salmonella* について凍結 (-80 ) 含気条件で 1.33、脱気条件で 1.21 kGy と得られていたが、既存論文との整合性が取れなかったため、追試を実施した。その結果、含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy という数値が得られ、結果の整合性を確認した。すなわち、本条件下で *Salmonella* 菌数を  $1/10^5$  とするには含気条件で 7.2、脱気条件で 7.9 kGy が必要と推察された。ただし、これは指数関数型として殺菌されたと仮定した場合の線量であり、シグモイド型による殺菌効果として考えた場合には上記殺菌線量は過大となる可能性も考えられた。このため、規定線量による *Salmonella* の殺菌効果確認試験を試みた。上記の検討結果から、おおよそ 6~8 kGy の照射により、*Salmonella* の菌数を  $1/10^5$  に減少させることが死滅曲線から予想されたため、約  $10^5$  CFU/g となるよう *Salmonella* を接種した検体 (n=5) を作成し、牛肝臓中の線量が 6、7、8 kGy となるような照射した場合の不活性化 (5 log cfu/g 低減の可能性) について検討を行った。その結果、凍結含気包装下においては 7 kGy で、凍結脱気包装下においては 8 kGy で、5 検体中全てから *Salmonella* は非検出となった。本試験にて接種した菌数は  $3.0 \times 10^5$

CFU/g と求められており、これまで作成した死滅曲線から得られた  $D_{10}$  値と併せても、妥当な結果と推察された。

#### (4) - 2 . 腸内細菌科菌群の放射線抵抗性に関する文献調査

生食用牛肉の規格基準においては、衛生基準として腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) を指標菌としているため、殺菌効果の検証に腸内細菌科用いる可能性を想定し、本研究での検討菌で最も放射線抵抗性が強かった *Salmonella* よりも抵抗性が強い腸内細菌科の細菌が存在する可能性について、文献調査を行った。Farkas の総説によれば、腸内細菌科細菌の放射線抵抗性は、*Yersinia enterocolitica* < *Shigella spp.* < *Escherichia coli* (O157:H7 を含む) < *Salmonella spp.* の順に大きくなると報告されている。また、2014 年に公表された、オーストラリア農務省の調査報告書に整理された細菌の放射線感受性のデータを参照に、腸内細菌科の  $D_{10}$  値を整理すると、*Salmonella* と並んで *Enterobacter sp.* の放射線耐性が高かった。*Enterobacter* 属菌について、Osaili らは、ブレインハートインフュージョン培地中、加水ミルクパウダー中および、乾燥ミルクパウダー中での *E. sakazakii* ATCC 51329 他 5 株の  $D_{10}$  値はそれぞれ、0.21- 0.29 kGy、0.24 - 0.37 kGy、1.06-1.71 kGy の範囲であったと報告している。また、Lee らは、TSB 中及び乾燥ミルクパウダー中での *E. sakazakii* strain ATCC 29544 の  $D_{10}$  値を、それぞれ 0.27 及び 0.76 kGy と報告している。*E. sakazakii* についての放射線抵抗性に

関する情報を考慮すると、牛肝臓中での *Enterobacter* 属菌の汚染可能性や放射線感受性について、今後さらに検討を要すると考えられる。

#### (4) - 3 . 牛肝臓のガンマ線照射による 2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)の生成

前年度の研究における 2-ACBs の定量結果では、線量依存的な 2-ACBs の生成を確認したものの、用いた分析法の添加回収率が 59%~68%と低かった。原因として、肝臓中の酵素による 2-ACBs の代謝反応が抽出中に進行する可能性が考えられた。そこで、肝臓を無水硫酸ナトリウムと混和後に高速ホモジナイザーを用いてヘキサンで抽出する方法から、硫酸ナトリウムによる脱水操作を止めてタンパク質が変性しやすいクロロホルム/メタノール溶媒を使って一気に抽出する方法に変更した。その結果、本年度用いた方法での添加回収率は、低濃度添加、2-dDCB および 2-tDCB を 3.3 ng/g FW、2-テトラデセニルシクロブタノン (2-tDeCB) を 8.1 ng/g FW で、 $96.2 \pm 5.7$ ,  $88.3 \pm 2.5$  および  $116.2 \pm 6.0\%$  (n=7)であった。また、高濃度添加として 2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB を 33 ng/g FW、33 ng/g FW、81 ng/g FW で添加した際の回収率は  $79.3 \pm 1.6$ ,  $73.5 \pm 3.1$  および  $77.4 \pm 2.1\%$  (n=7) であった。抽出方法を変更することで、回収率が向上し、回収率の標準偏差も小さくなった。

異なる温度包装条件で照射した際の 3 種の 2-ACBs の定量解析では、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

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 の生成量を求めた。この際の相関係数は、0.88~0.99 であった。

肝臓生重量 1g・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。また、-80 照射においては、含気包装時の 2-tDeCB の生成量は脱気包装より有意に大きかった。分析方法の変更により、昨年の報告値より、総じてやや高い値が得られたが、これまでの文献値にある他の畜肉での生成量に比べて著しく多量の 2-ACBs が照射牛肝臓中に生成することは無いと判断された。

#### (4) - 4 . 電子線照射に関する予備試験

##### (4) - 4 - 1 . 透過力の確認

電子線は線量率がガンマ線に比べて著しく大きい、その透過力はガンマ線に比べて劣っている。そこで牛肝臓に対する電子線の照射効果を検討する予備試験として、10 MeV 電子照射時の深部線量分布を確認した。

厚さ 86.4 mm(比重約 1g/cm<sup>3</sup>)の模擬試料に線量計を設置し、上面方向から 10 MeV 電子を照射した際の、線量分布の結果から、片面照射における電子の有効な透過厚さを、試料表面とほぼ同等の線量となる厚さと考え、試料厚さで約 36 mmが片面照射の上限厚さと考えられた。

片面照射時と同様に 4 枚重ねの模擬試料を両面照射した際の深度-線量分布では、照射した模擬試料の厚さは、81.5 mmであった。実測した線量分布から、最大/最小線量比(Dose Uniformity Ratio)は約 1.5 程度であった。また、中央部の線量が表面線量と同等の線量となる厚さを両面照射で透過可能な厚さであるとして、片面照射の深度線量分布のデータから両面照射において透過可能な厚さを推定すると、約 85 mmであった。

#### (4) - 4 - 2 . 殺菌効果の予備試験

前項の結果を参考に、重量 25g、厚み 10~15 mm 程度の牛肝臓の中心に  $3.1 \times 10^5$  CFU/g の *S. Enteritidis* IFO3313 株を接種して、含気、凍結状態(-80 )で 10 MeV 電子を両面から照射した(n=5)。目標線量 6、7、8 kGy に対して、ラジオクロミック線量計で測定した同形のダミー試料の吸収線量は、6.3、7.2、8.2 kGy (両面の平均)であった。含気条件、凍結状態(-80 )において 8kGy で、5 検体中全てから *Salmonella* は増菌培養を行っても非検出となった。7 kGy では、5 検体中 3 検体が陽性であった。この結果は、上述したガンマ線における殺菌効果とは一致せず、電子線の効果の方がガンマ線に比べて、やや劣る可能性を示唆している。ガンマ線と電子線の殺菌効果については、同等とするもの、電子線の効率が低いとするもの、ガンマ線の効率が低いとするものなど、異なる傾向が報告されている。ただし、これらの差異は極端なものではなく、また、殺菌効率の異なる理由も線量率の違いや、照射時の環境の影響の可能性も考察されておりガンマ線、

電子線の作用が本質的に異なるとは解釈されていない。牛肝臓の電子線照射については、今後、標的菌株の生残曲線を作成しての  $D_{10}$  値の算出など、さらに詳細に検討する必要がある。

#### (5) 高圧処理による検討

##### (5) - 1 . 鶏ササミ中に接種したサルモネラとカンピロバクターへの菌数低減効果

300MPa、5 分 6 回反復の高圧処理を 3 回実施し、処理前後の鶏ササミ中の菌数の平均及び標準偏差を求めた。

高圧処理前の鶏ササミにおけるサルモネラ及びカンピロバクターの菌数は、約  $1.04 \times 10^8$  CFU/g 及び約  $7.2 \times 10^7$  CFU/g であった。高圧処理後のサルモネラ菌数は、非選択培地である BHI 培地上に形成された集落数で、1 回目が  $8.5 \times 10^2$  CFU/g、2 回目が  $1.05 \times 10^6$  CFU/g、3 回目が  $9 \times 10^2$  CFU/g であった。3 回の試験のいずれにおいても、BHI 培地上の集落数は、選択分離培地である CHROMagarSalmonella 上よりも多く、高圧処理により損傷菌が発生している事が示された。高圧処理後のカンピロバクター菌数は 3 回とも菌が検出されず、検出限界以下となった。但し、いずれにおいても増菌培地を用いた定性試験においては、高圧処理後の検体からカンピロバクターが検出された。

##### (5) - 2 . 高圧処理が鶏ササミの色調と硬さに及ぼす影響

300MPa、5 分の高圧処理による鶏ササミの肉色及び硬さの変化を測定した。鶏ササミの肉色は、明るさを示す L 値が

300MPa の高圧処理の反復を行うことで大きくなり、色調の明るさが増す結果となった。一方、赤みを示す a 値は高圧処理により、未処理のものよりも小さい値となり、高圧処理により赤みが失われることが示された。黄色みを示す b 値は高圧処理により数値が上昇していた。いずれの値も、処理回数に比例しての増加ではないものの、1 回の処理で色調の変化を起こすことが示され、肉眼的な観察と相関する数値となった。硬さについては、最大破断点の加重により評価したところ、高圧処理の反復により加重値が上昇し、硬さが増すことが示された。

今回、過去の論文において有効とされた 5 分間の高圧処理を 6 回反復させる条件での検討を実施し、カンピロバクターに対しては 7 log 削減という高い菌数低減効果が可能となった。また、試験間の結果のばらつきも見られず、安定した効果が得られた。増菌培養により菌が検出されたため、完全な菌の除去には至らなかったものの、今回の条件が鶏肉中のカンピロバクター低減に効果的であることが示された。一方、サルモネラに対しては、平均して 3log の削減にとどまり、試験間のばらつきも大きかった。また、サルモネラについては損傷菌の発生が見られたことから、処理後の保存条件によっては生残菌数が増加する可能性があると思われた。これらの結果から、サルモネラがカンピロバクターよりも高圧処理に対する抵抗性が高いこと、今回の高圧条件はサルモネラに対しては効果が限定的であることが明らかとなった。一方、肉質の変化については、高圧処理により肉

色に変化しており、硬さも増加して、6 回の処理を行ったものについては、加熱処理したものと類似した肉色となっていた。以上の結果から、鶏ササミにおいて十分な殺菌効果を確保しつつ肉質変化を最低限に抑えた実用的な高圧処理条件を見いだすには、圧力条件と処理回数の組み合わせを変えた検討、高圧処理後の保管温度による生残性等の検討を追加する必要があり、生食用としての提供には、更なる検討が必要であるが、最終的な包装形態で殺菌処理を行うため、処理以後の工程で微生物汚染を受けることなく流通が可能な高圧殺菌は、畜産食品における衛生保持や品質保持期限の延長に有用であると思われる。

#### (6) 高圧処理を行った牛肝臓の微細形態の観察

高圧処理済みの牛肝臓について、電子顕微鏡を用いた微細形態の観察を行ったところ、細胞質のミトコンドリア内部に球状の無構造な凝集物が蓄積しており、その大きさは圧力の増加に伴い、増大していく様子が見られた。また、核の周囲に存在する粗面小胞体については、処理圧が高くなるほど不明瞭となっていた。

高圧処理後の牛肝臓の電子顕微鏡観察において認められたミトコンドリア内部の凝集物はミトコンドリア基質タンパクの変性によるものと考えられた。また、このようなミトコンドリアの変化は、光学顕微鏡観察において認められた細胞質内の好酸性小顆粒に対応しているものと考えられた。

#### D. 結論

本研究により、牛肝臓における住肉孢子虫の汚染実態の一部が明らかとなった。馬に寄生する *S. fayeri* が持つ下痢誘発毒性タンパク質と免疫学的に交差する物質が、牛の住肉孢子虫にも存在すること、その形態から *S. cruzi* と思われることが示された。厚生労働省が通知した馬肉中の住肉孢子虫遺伝子検査の方法が、牛検体においても応用可能であったが、顕微鏡による検査法の結果とのかい離もみられ、試験法の改善が必要と思われた。*S. cruzi* を原因とする食中毒事例の国内報告はなく、その病原性は不明である。今後、牛肉の住肉孢子虫の危害を分析するにはそれらの情報が必要である。

牛肝臓内の大腸菌群及び腸内細菌科菌群の各種消毒薬と凍結融解を組み合わせた殺菌法は、用いる消毒薬の種類によってはある程度の低減効果は認められた。しかしながら、現状では十分でなく更なる検討が必要である。一方、STEC 汚染については、一部肝臓表面から *stx* 遺伝子が検出されたが、肝臓内から *stx* 遺伝子は検出されなかった。特に、生食用として提供されていた部位 1 と 2 では調べた 136 検体で *stx* 遺伝子は全く検出されなかった。今後さらに検体数を増やして、慎重に検証して行く必要がある。

牛肝臓内部に接種した *Salmonella* Enteritidis IF03313 株のガンマ線殺菌を行い、 $D_{10}$  値として、凍結 (-80 ) 含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58kGy を得た。また、*Salmonella* を  $10^5$  CFU/g 接種した検体について、目標線量、6、7、8 kGy となるよう 3 段階の線量のガンマ線を照射した場合、含気条件では 7、脱気条件では 8

kGy で *Salmonella* が非検出となった

( $n=5$ )。副生成物については、抽出法を変更して回収率を向上させた分析法により、冷凍(0 ) 6 kGy, 凍結(-80 )10kGy までの牛肝臓のガンマ線照射における、2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB の生成量を再確認した。分析方法の変更により、昨年の報告値より総じてやや高い値が得られたが、これまでの文献値にある他の畜肉での生成量に比べて著しく多量の 2-ACBs が照射牛肝臓中に生成することは無いと判断された。

鶏ササミに人工的に添加した食中毒原因菌の高圧処理による不活化を検討したところ、300MPa で 5 分を 6 回反復する処理により、カンピロバクターは 7 log、サルモネラは 2-5log の菌数低減が可能であった。一方、鶏ササミの肉質については、高圧処理により色調や硬さに変化が見られたため、生食用としての提供を可能にするには更なる条件検討が必要と思われた。

高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関して検討を行った結果、光学顕微鏡による観察において認められた細胞質内の好酸性小顆粒がミトコンドリアの変性によって生じた変化であることを明らかにした。高圧処理を行った牛肝臓の硬さの変化は、肝細胞の索状配列や小葉構造などの肝臓の組織構造の変化によるものではなく、細胞内の微細構造の変化に起因するものであると考えられた。

#### E. 健康危機情報

牛の肝臓内から直接 STEC の存在は確認できなかったが、大腸菌群及び腸内細菌科菌群が検出され、また、塩素系消毒薬と凍

結融解を組み合わせた方法で完全に殺菌できなかった。現状では、牛の肝臓内には大腸菌群の汚染率が高く、牛肝臓を生で食べることは免疫力の弱い小児や老人では大きなリスクとなる可能性がある。

#### F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

講演・研修会等

川崎晋, 持田麻里, 等々力節子, 五十君静信. ガンマ線照射による牛肝臓・挽肉中での腸管出血性大腸菌の殺菌効果、第 19 回 腸管出血性大腸菌研究会(東京), H27/7/9-10.

#### G. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし

平成 27 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

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：  
牛肉中の食中毒危害性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 三井 太平 （岩手県食肉衛生検査所）

畜産食品には微生物や化学物質等、各種の有害物質の汚染がある。その一つとして、寄生虫が認識されている。草食および雑食動物である家畜においては、Sarcocystis 属住肉胞子虫が危害の一種となっており、馬肉食中毒に代表されるように、畜産食品による寄生虫食中毒が発生している。国民によく食されている牛肉について、その有害性を調査した研究がない。また、牛肉を対象とした住肉胞子虫検査法も検討されていない。薄切切片を観察する古典的な方法で、牛の可食部、その他の部位の肉を検索したところ、*S. cruzi* の寄生を否定できる部位がなく、牛肉について、住肉胞子虫の有害性を検証する必要性を認めた。牛の個体によって、また、部位によって、住肉胞子虫の多少が確認された。馬肉を対象としての住肉胞子虫遺伝子検査法が牛肉に適応できるか検証した。牛肉から抽出した DNA をテンプレートに、住肉胞子虫の 18S rRNA 遺伝子を標的とした定性 PCR を行った。その結果、馬に寄生していた *S. fayeri* 虫体から抽出した DNA と同様の結果を得、牛肉に、現行の住肉胞子虫定性 PCR 法が適応できることが確認された。

牛肉の薄切切片を観察してのシスト陽性率および陰性率を把握した後、遺伝子検査法結果の陽性率および陰性率をそれぞれ比較した。薄切切片でのシスト陽性件数のおよそ半分が遺伝子検査陰性だった。また、薄切切片でのシスト陰性件数もその半分が遺伝子検査陽性だった。シストの存在比率と、遺伝子検査陽性比率が大きくかい離していた。

以上の成績から、牛肉においては、寄生する住肉胞子虫の病原性の強さが不明であり、住肉胞子虫の有害性を排除できず、今後検証する必要があること、住肉胞子虫の検査法、特に遺伝子検査法について、食中毒原因を診断する方法として定性 PCR 法は問題ないと考えられた。一方、有害性を評価するには、病原性に関する知見の蓄積が必要であり、また検査法としては牛肉の処理量と、定量性を持った検査法が必要であることが示唆された。

A . 研究目的

馬肉食中毒が認知されてきた。馬肉の喫食後数、短時間で、一過性に下痢や嘔吐などの消化器症状が起こり、長くとも数日で回復す

る(1)。事例が分析され、馬肉中に存在する住肉胞子虫によって食中毒が発生することが明らかになった(1)。住肉胞子虫は草食動物である中間宿主の筋肉中にシストとして寄生する。

シスト中には多数の成熟虫体であるブラディゾイトが集積している。馬に寄生している住肉胞子虫は *Sarcocystis fayeri* とされている。患者喫食馬肉や単離した *S. fayeri* のシストを用いた分析から、ブラディゾイト中に含まれるタンパク質が、直接の下痢誘発物質として同定された(2)。

*S. fayeri* はイヌあるいはイヌ科の動物を終宿主、草食動物であるウマを中間宿主とする住肉胞子虫である(3 - 5)。終宿主から排泄されたスポロシストが牧草等を汚染する。ウマが牧草を食べる際にスポロシストが取り込まれ、メロゴニーが誘発され、その後、長さ1 cm 前後、幅1 mm 前後のシストを筋組織に形成する。シストを含んだ馬肉を終宿主のイヌあるいはイヌ科動物が捕食すると、シストは胃を通過し、腸内でブラディゾイトを放出する。腸管上皮細胞に侵入したブラディゾイトは、その後ガメートゴニーを経、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(5)。

厚生労働省が馬肉中の住肉胞子虫を検査する方法を通知している。住肉胞子虫の18S rRNA 遺伝子を標的とした遺伝子検査と、顕微鏡を用いた検査法で、遺伝子検査は、定性法として、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 µL 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 rRNA 遺伝子を検出する定性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。

上述したように、住肉胞子虫は、草食動物

と肉食動物で寄生環が維持されている(図1)。家畜も例外なく住肉胞子虫の寄生を受ける。ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジにそれぞれ、固有の住肉胞子虫と、それら胞子虫が次世代を作る終宿主が明らかになっている(表1)。馬肉食中毒の原因が住肉胞子虫であることが明らかになった後、食中毒危害性の観点から、ウシにおける住肉胞子虫寄生状況を調べた報告がある(6)。岐阜県のと畜場での成績であるが、分離したシストの形態情報と、18S rRNA 遺伝子の塩基配列解析から、分離した住肉胞子虫が *S. cruzi* であることを確認後、顕微鏡検査によって、乳廃用牛ホルスタイン種53頭、肥育牛黒毛和種56頭、交雑種62頭が調べられた。検査部位は心筋で、実体顕微鏡および薄切切片のヘマトキシリン・エオシン(HE)染色標本中にシストが確認できればシスト陽性とし、HE染色標本では、シストの個数も計数している。シスト陽性率は、乳廃用牛94.3%、肥育黒毛和種牛53.6%、交雑種32.3%となっている。標本中の *S. cruzi* は、上述した毒性タンパク質の抗体で染色され、*S. cruzi* は、*S. fayeri* が持つ毒性タンパク質と免疫学的に交差性のあるタンパク質を保有することを明らかにしている。心筋における *S. cruzi* の汚染頻度は高く、また、毒性タンパク質が保有されていることから、*S. cruzi* の危害性を明確化する必要がある。一方、海外のウシにおける *S. cruzi* の寄生について文献を検索したところ、*S. cruzi* が寄生した牛肉の喫食が原因と断定された食中毒は報告されていない。また、*S. cruzi* の病原性の強さに関する報告もなされていない。

本年度は、牛の可食部やその他の部位の肉について、住肉胞子虫の遺伝子検査法を適応し、*S. cruzi* の汚染状況を調査し、牛肉の、住肉胞子虫による危害性を調査する際の方法論を整備することを目的とする。

## B . 研究方法

### B-1. 牛肉における住肉胞子虫検査

平成25年11月中に、岩手県食肉衛生検査所

に病畜として搬入されたウシ 6 頭を用いた。ウシの品種はホルスタイン種で、月齢は 44 ~ 101 カ月齢、すべてメスで、岩手県産である。各牛からそれぞれ筋肉 8 ~ 9 カ所、計 52 カ所を採材した。

採取部位は、心筋、横隔膜筋、咬筋、ネック、カタ、リブローズ、ヒレ、モモ、舌を選出した。

#### 1) 組織標本中の住肉胞子虫検出

材料 1 検体あたり 2 x 2 x 2 cm のブロックを切り出し、10%中性ホルマリン緩衝液で固定した。固定したブロックについて、筋肉の走行に垂直に切り出し、常法に従ってパラフィン包埋した。薄切し、HE 染色を施した。染色後の切片 1 x 1 cm 中の、住肉胞子虫シストを計数した。住肉胞子虫のシストは、内部に、ヘマトキシリンに染まるブラディゾイトを多数含んだ袋状の構造物として検出される。

#### 2) 住肉胞子虫遺伝子検査法

厚生労働省が通知した、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法(7)を参照した。採材した肉検体から 0.3 g を取り出し、ミンチ状とした。ミンチを 1.5 ml のエッペンチューブに移し、TE 緩衝液を加えて 1 ml とした。チューブを 30 秒間激しく振盪させた。卓上の遠心分離器を用いて 3,000 rpm で約 10 秒間遠心分離し、上清を回収した。この軽度の遠心分離によって、肉片は沈殿し、ミンチ中に含まれるブラディゾイトあるいはシストは、上清に回収される。0.2 ml の上清から、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて、DNA を抽出精製した。

以下の方法で、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子を標的とする DNA 断片の増幅と、アガロースゲル電気泳動を行い、住肉胞子虫の定性 PCR 法による試験を行った。

プライマーは厚生労働省通知のものを用いた。PCR 条件も含め、表 2 に記載した。用いた試薬は 10 x Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa)である。得た PCR 産物について、研究室保有の *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子増幅断片陽性コントロ

ールとともに、Mupid-2 plus (ADVANCE) でアガロースゲル(2%)電気泳動を行った。DNA サイズマーカーには 100bp plus DNA ladder (BIO CRAFT)を、検体の添加には 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、ATTO) で結果を観察した。陽性の判断基準として、約 1,100 bp の遺伝子増幅産物が確認されることとした。

#### B-2 住肉胞子虫毒性タンパク質の検出

*S. fayeri* が持つ下痢誘発毒性タンパク質に対する抗体を用いて、検査筋肉中のシストの、免疫学的交差性のある毒性物の存在を検証した。同抗体は、国立医薬品食品衛生研究所でウサギを用いて作成されたポリクローナル抗体で、*S. fayeri* 虫体から分離された 15kDa タンパク質への抗体を示している。

上に記載したパラフィン切片について、脱パラフィンし、抗毒性タンパク質抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Sigma)、および発色剤としてペルオキシダーゼ染色 DAB キット Brown Stain (ナカライテスク)の順で反応させた。封入後、光学顕微鏡下で、陽性の指標として褐色反応があるかどうか確認した。

### C . 研究結果

#### C-1 牛肉中の住肉胞子虫顕微鏡検査

咬筋の薄切 HE 染色標本中に、エオシンに強く染まる筋線維のなかで、同じくエオシンに染まるシスト壁に囲まれ、ヘマトキシリンに強く染色される構造物を認めた。同構造物はブラディゾイトを包有した住肉胞子虫のシストと判定された(図 2)。シストの形態は *S. cruzi* を推定させた。

#### C-2 抗 *S. fayeri* 毒性タンパク質抗体を用いた住肉胞子虫シストに対する免疫組織学的検証

咬筋のパラフィン切片標本を脱パラフィンし、抗毒性タンパク質抗体で処理した。光学

顕微鏡で観察したところ、前述の、住肉胞子虫のシストと認識される構造物が、褐色に染色された。シストを観察すると、褐色に染色されるのはシスト内の多数の構造物であり、ブラディゾイトが染色されていた。この染色状態は、これまで報告されている馬肉(1)、および牛肉(心筋)(6)と同一だった。以上の結果は、馬に寄生する *S. fayeri* が持つ下痢誘発毒性タンパク質と免疫学的に交差する物質が、ウシに寄生している住肉胞子虫にも存在すること、また、心筋だけでなく咬筋を寄生部位とする住肉胞子虫にも同タンパク質が存在する可能性が高いことを示している。また、咬筋に寄生する構造物が、*S. cruzi* であることを裏付ける。

#### C-3 顕微鏡下で計数した牛肉中住肉胞子虫シスト数

6頭の牛の9部位における、住肉胞子虫のシストを計数した(図3)。6頭の牛のいずれかの部位に、住肉胞子虫シストを確認した。シストが最も効率に検出される部位は心筋で(100%)、次に横隔膜筋および咬筋(83.3%)だった。9カ所すべての部位からシストが検出されたのは6頭のうち、2頭だった。

シストの数を測定した。個体によって変動がみられたが、心筋では、1cm<sup>2</sup>当たりの平均シスト数は、0.1から3.5を示した。心筋が最もシスト数の多い部位だった。次にシストが多く観察された部位はヒレで、以下ネック、舌と続いた。

#### C-4 牛肉中の住肉胞子虫遺伝子検査

ウシの筋肉各部位から抽出したDNAをテンプレートとして、住肉胞子虫遺伝子検出操作を実施した。住肉胞子虫遺伝子用のPCRの条件は馬肉について検討されたものであるため、馬肉より抽出した *S. fayeri* 虫体から抽出したDNAを陽性対象とした。図3に示すように、30サイクルのPCRで、*S. fayeri* 由来DNAでは、約1,100bpの位置に非常に明瞭なDNA断片のバンドを検出した。陽性対象ほ

どではないが、ウシのネック部、横隔膜、舌からのDNAについて、約1,100bpのDNAの増幅が確認された。DNAサイズが同様で、明確にバンドが検出されたことから、食中毒診断を目的としての馬肉中の住肉胞子虫(*S. fayeri*)を対象とした遺伝子定性検査法は、牛肉より抽出したDNAへの応用が可能であると判ぜられた。

#### C-5 牛肉中の住肉胞子虫検出に関する顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果の相関

顕微鏡下による住肉胞子虫シストの確認と、同一筋肉部位から抽出したDNAをテンプレートとした、住肉胞子虫遺伝子検査結果の相関を検討した。表3にその結果をまとめた。顕微鏡下で陽性だった38検体のうち、遺伝子検査陽性だったのは20、陰性は18だった。顕微鏡下でシストが確認できなかった14検体については、それらのうちの7検体から住肉胞子虫の遺伝子増幅が確認された。以上の結果は、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果が、大きくかい離することを示している。

#### D. 考察

現行の馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法を、牛肉に適用し、その妥当性を検討した。また、牛6頭の、各々8~9カ所の筋肉部位について、住肉胞子虫を検出する顕微鏡検査と遺伝子検査の両方を実施し、その検出率の優劣と相関を検討した。同寄生虫の寄生の程度について考察した。

現行の住肉胞子虫を顕微鏡下で確認する方法は、筋肉片の均質化液を光学顕微鏡で観察し、遊離してくるブラディゾイトを確認するか、実体顕微鏡を用いて筋肉片からシストを摘出してシストを確認、その後シストから遊出するブラディゾイトを確認するとなっている。この方法では、ブラディゾイトを検出するのに習熟した技術を要求され、顕微鏡検査を正当に行えない危険性がある。そのため、古典的で、かつ、手間暇を要求されるが、薄切切片を作製し、ヘマトキシリンに濃染する

ブラディゾイトの集団と、それらを取り囲むシストを光学顕微鏡下で確認する方法を採用した。

牛の咬筋を観察したところ、明瞭なブラディゾイトの集団とそれらを取り囲むシストを確認した。シスト壁の構造から、検出した住肉胞子虫は *S. cruzi* と判定された。結果には示していないが、遺伝子検査で実施して得た PCR 産物の塩基配列を調べたところ、*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子と相同性があることが確認された。

同シストに対し、*S. fayeri* から分離された下痢誘発性毒性タンパク質への抗体による免疫染色を行ったところ、陽性反応が得られた。ウシについては、心筋において、毒性タンパク質を保有する *S. cruzi* の存在が報告されている。本研究では、咬筋においても下痢誘発性毒性タンパク質を有する *S. cruzi* の寄生が確認された。

牛の咬筋あるいは、可食部の筋肉の全てから、住肉胞子虫のシストが顕微鏡下で確認された。そのシスト数には多少があり、検出されない部位もあった。しかしながら、検査を行った 6 頭すべてにおいて、共通してシストが検出されなかった部位はなく、住肉胞子虫の危害について牛体の中で例外部位はないと考えるべきと推察する。

厚生労働省が通知する、馬肉を対象とした遺伝子検査法を牛肉に適用できるか検討した。馬肉から抽出した *S. fayeri* 虫体からの抽出 DNA と同様、牛の咬筋や舌から抽出した DNA をテンプレートに PCR を行ったところ、同じ DNA サイズのバンドが、牛由来 DNA でも明瞭に観察された。副次的なバンドも多少あるものの、検査結果の評価に支障はなく、馬肉における住肉胞子虫遺伝子検査法が、牛肉にも適用可能なことが確認された。

牛肉中の住肉胞子虫について、薄切切片でシストを確認する方法と、適用可能なことが明らかになった遺伝子検査法との相関を検討した。薄切切片でシスト陽性が確認された検体のおよそ半分しか遺伝子検査陽性とならな

かった。さらに、薄切切片でシスト陰性となった検体の半分は、遺伝子検査陽性となり、遺伝子検査結果と顕微鏡検査の結果が大きくかい離した。

筋肉の薄切切片を染色し、住肉胞子虫のシストを確認する方法の信頼度は高い。シストを 1 つでも確認できれば陽性を示すことができる。しかし、同法はブロック状の筋肉組織の、数  $\mu\text{m}$  における検査である。一方、遺伝子検査においても、DNA を抽出するのは検体のわずか 0.3 g に過ぎない。今回調査した牛肉、および食中毒の原因となった馬肉を顕微鏡で観察すると、住肉胞子虫のシストは、筋肉に均質に分布していなかった。一方、シストの中には、非常に多数のブラディゾイトが集合しており、住肉胞子虫の DNA は、筋肉のなかで極めて局在化している状態になっている。以上から、牛肉における住肉胞子虫の危害性を評価するには、現行の住肉胞子虫食中毒を診断する顕微鏡検査法および定性 PCR 法を改良する必要があると考える。

昨年度の馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法に関する検討で、定量 PCR の有用性を示した。また、DNA を抽出する検体量の増加、ならびにその均質化が検査結果のばらつきを少なくするのに有効であることを示した。*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列は、*S. fayeri* のそれと部分的に一致し、また、それぞれに固有の部分がある。それらを利用し、DNA 抽出のための牛肉の量を増やし、均質化した後に DNA を抽出すること、さらに、*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子をクローニング後、その標準 DNA と検量線を用いての定量 PCR 法を構築することが推奨される。

## E . 参考文献

- 1) Harada, S., Furusawa, M., Tokuma, E., Matsumoto, K., Yahiro, S., Miyasaka, J., Morihiro, S., Kamata, Y., Watnabe, M., Irikura, D., Matsumoto, H., Sugita-Konishi, Y. Control Toxicity of

*Sarcocystis fayeri* in Horsmeat by Freezing Treatment and Prevention of Food Poisoning Caused by Raw Consumption of Horsemeat. Food Hyg. Safety Sci. 54, 198-203. 2013

- 2) Kamata, Y., Saitou, S., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, T., Inui, T., Watanabe. M., Sugita-Konishi, Y. A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsmeat may be responsible for food poisoning. J. Food Prot. 77, 814-819, 2014.
- 3) 齊藤 守弘. *Sarcocystis fayeri* 感染馬肉による食中毒. 2012. 獣医疫学雑誌 . 16 , 114-125
- 4) 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, 21-27. 2011.
- 5) 板垣 博、大石 勇監修：最新家畜寄生虫病学、朝倉書店、東京、2009.
- 6) 松尾加代子、佐藤 宏：岐阜県内だと畜された牛の住肉孢子虫調査、日獣会誌、65, 791 - 794, 2012.
- 7) *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](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、わが国における寄生虫性食中毒の発生状況 厚生労働省食中毒統計からの解析、食品衛生研究 65, 25 - 31, 2015 .

#### 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。



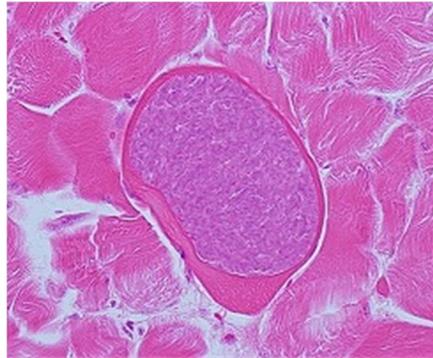


図2 牛咬筋のH E 染色像

シストと、ヘマトキシリンに濃染されるブラディゾイトが確認される。

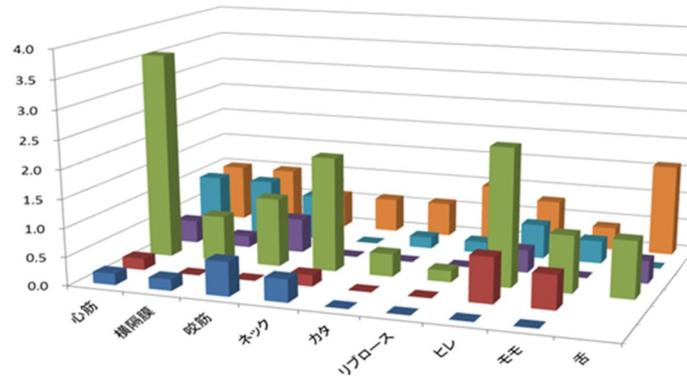


図3 牛6頭の筋肉各部位における住肉胞子虫シスト数

縦軸は顕微鏡下で計数した1 cm<sup>2</sup>当たりのシスト数を示す。各色は、牛の個体を示す。

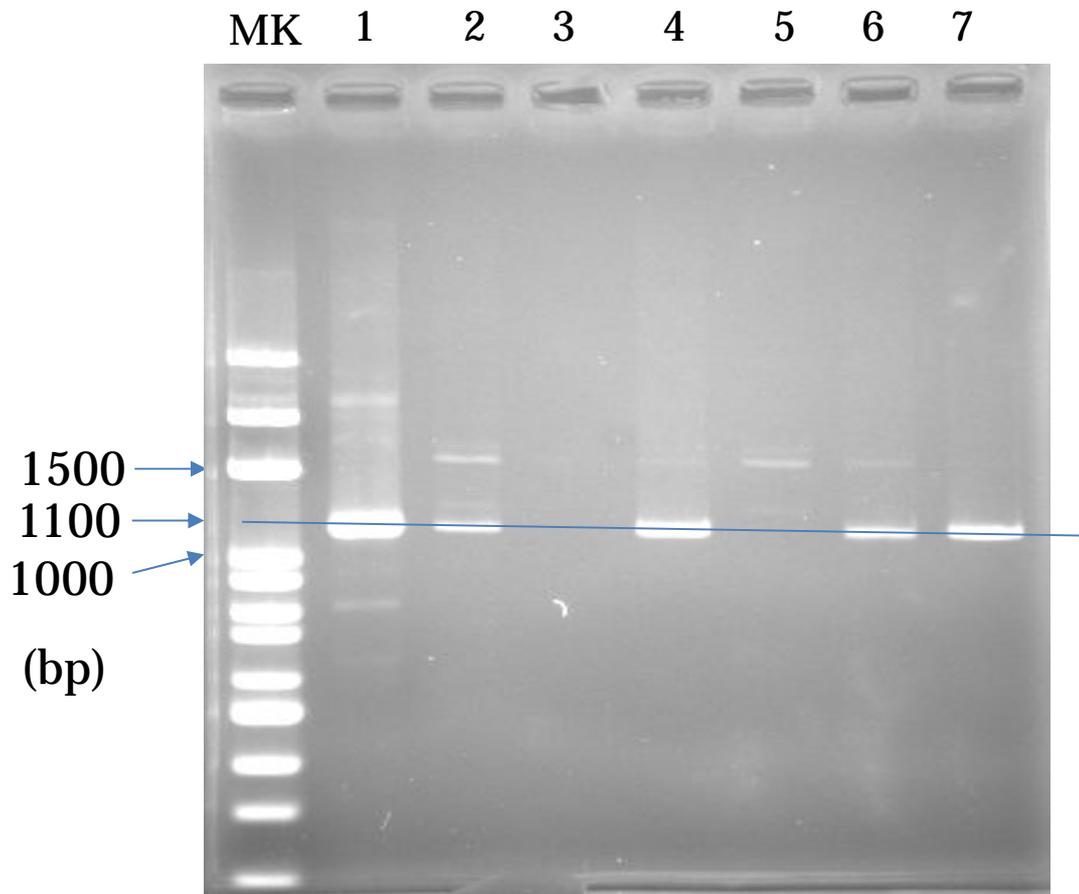


図4．牛肉から抽出した DNA をテンプレートとした時の住肉胞子虫遺伝子検査

M K : DNA サイズマーカー

レーン 1 ; 馬肉由来 *S. fayeri* シスト抽出 DNA

レーン 2 : 牛 ネック抽出 DNA

レーン 3 : 牛 咬筋抽出 DNA

レーン 4 : 牛 横隔膜筋抽出 DNA

レーン 5 : 牛 カタ抽出 DNA

レーン 6 : 牛 タン抽出 DNA

レーン 7 : 牛 タン抽出 DNA

表1 *Sarcocystis* 属の宿主

中間宿主	<i>Sarcocystis</i> 属	終宿主
ウシ	<i>S. cruzi</i>	イヌ
	<i>S. hirsuta</i>	ネコ
	<i>S. hominis</i>	ヒト
ブタ	<i>S. miescheriana</i>	イヌ
	<i>S. porcifelis</i>	ネコ
	<i>S. suihominis</i>	ヒト
ヒツジ	<i>S. ovis</i>	イヌ
	<i>S. renella</i>	ネコ
ウマ	<i>S. bertrami</i>	イヌ
	<i>S. fayeri</i>	イヌ

表2 牛肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法：PCR条件

プライマー			
フォワード		5' -GGATAACCGTGGTAATTCTATG-3'	
リバース		5' -TCCTATGTCTGGACCTGGTGAG-3'	
PCR条件			
変性		94	3分
サイクル数		30	
	変性	94	30秒
	アニーリング	60	60秒
	伸長	72	60秒
伸長		72	5分

表3 牛肉中の住肉胞子虫検出における  
顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果の相関

顕微鏡検査	検体数	遺伝子検査	
		陽性	陰性
		27	25
シスト陽性	38	20	18
シスト陰性	14	7	7

平成 27 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 牛肝臓内の大腸菌の分布とその殺菌法の検討

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：牛の肝臓内に存在する大腸菌群及び腸内細菌科菌群を塩素系・非塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせることで殺菌可能な種々の消毒薬を用いて、肝臓を5カ所（部位1-5）あるいは2カ所（左葉 [部位1と2]と右葉 [部位3-5]）に分けて評価した。殺菌効果は消毒薬の種類によってかなり差があり、ある消毒薬では40%で完全に腸内細菌科菌群が検出されなくなったのに対し、ある消毒薬では調べた全ての検体において腸内細菌科菌群が検出された。さらに、肝臓検体を増菌培養後PCR法で2種類の志賀毒素（*stx1/2*）遺伝子を検出したところ肝臓表面から *stx2* 遺伝子が検出されたが、5つの部位を含め肝臓内部からはいずれの *stx* 遺伝子も検出されなかった。

A. 研究目的

牛肝臓内から腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）O157が検出されたことから生レバーの喫食が禁止となった。一方、消費者からの生レバー復活に対する期待は大きい。現状の牛肝臓を生で食するとSTEC感染症に罹患し、特に小児や老人では、溶血性尿毒症症候群や脳症を併発する可能性も否定できない。

牛肝臓内のSTECを含む大腸菌群の汚染は胆管を経由していると仮定し、平成25年度、平成26年度に牛肝臓を5つの部位に分けて大腸菌群の分布を調べた。その結果、部位1と2（生食用として提供されていた部位）では陽性率が低く部位3から5（生食用でなく加熱用として提供されていた部位）で高いことがわかつ

た。一方、夏場では大腸菌群の肝臓内での陽性率が高く、冬場では陽性率が低いことも明らかとなった。また、*stx* 遺伝子は部位3-5からは検出されたが、部位1と2からは検出されなかった。

本研究では、牛肝臓内に存在する腸内細菌科菌群の殺菌法の開発を目的とし、本年度は種々の塩素系・非塩素系消毒薬を胆管から肝臓内に注入し、凍結融解法と組み合わせた殺菌効果を検討した。さらに、牛肝臓の部位ごとのSTECの汚染状況を調べる目的でPCR法にて *stx* 遺伝子の検出を継続して行った。

B. 研究方法

1. 牛肝臓内の大腸菌群の菌数と各種消毒薬の殺菌効果の比較

1-1. 肝臓を5つの部位に分けた場合

屠畜解体直後に牛肝臓と胆汁を採取し、肝臓については、塩素系消毒薬（A と E）と抗菌活性確認されている非塩素系消毒薬（B、C、D）を胆管内に注入し肝臓内を洗浄、殺菌した。その後、図に示したように肝臓を5つの部位、すなわち生食用として提供されていた部位1と2、加熱用として提供されていた部位3から5に分け、それぞれの部位から約50g（2015年1月より3月まで）あるいは約100g（2015年4月より9月まで）を採取し、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。ストマッカー処理した肝臓検体と胆汁をそれぞれ滅菌PBSで段階希釈し、得られた100μLをMacConkey寒天培地に植菌し、大腸菌群の菌数を測定した。そのうち部位1と2は、さらに25gの肝臓を採取し、-30°Cで凍結融解後、同様の処理を行い、大腸菌群の菌数を測定した。さらに、BPW培地で増菌した培養液をVRBG寒天培地に植菌し37°Cで一晩培養した。コロニーが得られなかった場合、さらに、EE培地で増菌培養を行いVRBG寒天培地に植菌し37°Cで一晩培養後、腸内細菌科菌群の有無を判定した。

#### 1-2. 肝臓を左葉、右葉で分けた場合

2015年10月より、肝臓を部位1と2に該当する左葉と部位3-5に該当する右葉に分け、それぞれ10カ所から5g、合計50gを採取して上記と同様に処置した。さらに、10カ所から2.5gずつ採取し合計25gを-30°Cで凍結融解後、上記と同様に処置した。

#### 2. 肝臓内部、表面、胆汁と肛門組織からの *stx* 遺伝子の検出

1に記した方法と同様に肝臓検体を処理した後、TSBで増菌培養後、*stx1*と*stx2*を同時に検出できるマルチプレックスPCR法で*stx*遺伝子を検出した。尚、2015年1月から3月までは、50gの肝臓を、4月から9月までは100gの肝臓を取り出し、それぞれ等量のPBSを加え、ストマック処理を行なった後、1mLを1.25xTSB、4mLに加え37°Cで一晩増菌培養した。2015年10月から12月までの検体は、50gの肝臓に50mLのTSBを加えストマック処理を行った。その後、TSBで総量250mLとなるようにメスアップし、37°Cで一晩増菌培養した。それぞれの増菌培養液1mLを回収し、遠心分離後上清を捨てペレットに1mLのTEを加え、100°C、10分間加熱処理した。遠心分離後、上清を回収し鋳型DNAとしてPCRに供した。

#### C. 研究結果

##### 1-1. 肝臓を5つの部位に分けた場合の大腸菌群の菌数と消毒薬の殺菌効果

2015年1月から9月までの間に調べた結果を表1にまとめた。消毒薬Aを肝臓内に注入した場合、生食用として提供されていた部位1と2での陽性率は26%と23%と、他の消毒薬の56-86%と比べ低かった。一方、加熱用として提供されていた部位3-5では、全体的に陽性率が高かった（70-100%）が、消毒薬Aでは菌の陽性率は、50-60%と他の消毒薬と比較して低かった。

さらに、凍結融解を組み合わせた殺菌効果について調べた結果を表2に示した。凍結融解後2回増菌した場合、部位1と2とも60%で腸内細菌科菌群が検出された。言い換えれば、40%では腸内細菌科菌群が全く検出されないレベルであった。一方、消毒薬B、C、Dでは凍結融解後の大腸菌群の陽性率は33-60%であったが、2次増菌後の腸内細菌科菌群の陽性率は90-100%であった。さらに、消毒薬AとEの効果をより詳細に調べることを目的に、肝臓を生食用として提供されていた部位1と2を左葉、加熱用として提供されていた部位3-5を右葉に分けて、10カ所から採取した結果を表3にまとめた。腸内細菌科菌群の陽性率の低かった消毒薬Aを2つの濃度(2,000 ppmと500 ppm)で評価し、さらに別の塩素系消毒薬Eについても評価した。その結果、消毒薬Aが500 ppmの場合、右葉では凍結無しで100%大腸菌群が陽性であったのに対し、左葉では凍結無しで44%の陽性率であった。さらに、凍結融解後は陽性率が33%まで下がったが、2次増菌を行うと陽性率が89%まで上がった。2,000 ppmを用いた場合もほぼ同様の結果であった(表3)。一方、消毒薬E(400 ppm)を用いた場合、凍結無、凍結融解後の陽性率はそれぞれ8%、2次増菌後の陽性率は50%であった。

## 2. 肝臓内部、表面、胆汁及び肛門組織からの *stx* 遺伝子の検出

0.5 g/1.0 g 相当の増菌培養液から PCR 法で *stx* 遺伝子の検出を試みたところ、88 検体の肝臓内部、80 検体の胆汁からは

*stx* 遺伝子は検出されなかった(表4)。一方、87 検体の肝臓表面から4検体で *stx2* 遺伝子が検出された。最も汚染率が高い肛門組織を陽性コントロールとして81検体調べたところ、64検体から *stx1*、*stx2* 遺伝子のどちらか一方あるいは両方が検出された。さらに、50 g 相当となるように増菌培養した検体では、調べた48検体全てで肝臓左葉と右葉、及び胆汁36検体から *stx* 遺伝子は検出されなかった(表5)。肝臓表面からは調べた48検体中、6検体で *stx2* 遺伝子が、肛門組織からは調べた30検体中、27検体でいずれかの *stx* 遺伝子が検出された。

尚、0.5/1.0 g 相当の増菌培養液での検出下限は62 CFU/50 g、50 g 相当の増菌培養液での検出下限は6.2 CFU/50 g であった。

## D. 考察

昨年度までの研究で牛肝臓内の大腸菌群の分布は生食用として提供されていた部位1と2は、加熱用として提供されていた部位3から5と比べて汚染率が低く、また、胆汁の陽性率よりも肝臓内の汚染率の方が高いことが明らかとなった。その理由として、肝臓内の大腸菌群は、胆汁も汚染源の1つではあるがそれ以外にも汚染源がある可能性が考えられ、その1つが血管(門脈、静脈)であった。

本年度の研究では、種々の塩素系消毒薬と非塩素系消毒薬の肝臓内大腸菌群及び腸内細菌科菌群の殺菌効果について比較した。調べた検体数は必ずしも十分でなく、また、季節性を考慮できていない点も含め今回の結果でどの消毒薬が最も

優れているか結論づけることはできないが、消毒薬の種類によって効果に違いがあった(表1)。さらに殺菌効果を上げる目的で各種消毒薬と凍結融解を組み合わせて評価したところ(表2)、消毒薬 A (2,000 ppm)を用いた場合、25 gの肝臓検体をBPWとEE-brothによる2次増菌培養を行った後でも部位1と2の40%で腸内細菌科菌群は全く検出されなかった。このことはロットによっては消毒薬 A (2,000 ppm)と凍結融解を組み合わせることによって検出される腸内細菌科菌群をゼロにできる可能性を示している。さらに詳細に調べる目的で、生食用として提供されていた部位1と2をまとめ左葉とし、加熱用として提供されていた部位3から5を右葉としてそれぞれ、2.5 gを10カ所から回収し同様の実験を行った。その結果、表3に示したように消毒薬 A (2,000 ppm、500 ppmとも)では凍結融解後の陽性率は下がったものの2次増菌後は約90%で腸内細菌科菌群が検出された。消毒薬 Eを用いた場合は、2次増菌後の陽性率が50%と最も良い結果が得られたが、調べた肝臓における汚染菌数も元々少なかった。凍結融解後に陽性となった1検体は胆汁中に $10^7$  CFU/mlの大腸菌群が存在していたものであった。今後さらに殺菌効率を上げる為の検討、あるいは、事前に汚染菌数の高い検体を検出できる方法を開発し、汚染菌数の少ない特定の肝臓のみ殺菌する方法の開発が求められる。

一番問題となる STEC 汚染については、今年度調べた限り牛肝臓内部から *stx* 遺伝子は検出されなかった。また2次増菌

後の増菌培養液からも *stx* 遺伝子は検出されなかった。一方、牛肝臓表面からは *stx2* 遺伝子が検出された。肛門組織においても *stx2* 遺伝子の陽性率が高いことから、おそらく、屠畜解体時に牛の糞便を介して肝臓表面を汚染したものと考えられる。いずれにせよ、さらに検体数を増やして牛肝臓内部に STEC が混入しているのか、もし、混入するとすればどのような経路でどの部位が汚染するのかについて調べて行く必要がある。

#### E. 結論

牛肝臓内の大腸菌群及び腸内細菌科菌群の各種消毒薬と凍結融解を組み合わせた殺菌法は、用いる消毒薬の種類によってはある程度の低減効果は認められた。しかしながら、現状では十分でなく更なる検討が必要である。一方、STEC 汚染については、一部肝臓表面から *stx* 遺伝子が検出されたが、肝臓内から *stx* 遺伝子は検出されなかった。特に、生食用として提供されていた部位1と2では調べた136検体で *stx* 遺伝子は全く検出されなかった。今後さらに検体数を増やして、慎重に検証して行く必要がある。

#### F. 健康危機情報

牛の肝臓内から直接 STEC の存在は確認できなかったが、大腸菌群及び腸内細菌科菌群が検出され、また、塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせた方法で完全に殺菌できなかった。現状では、牛の肝臓内には大腸菌群の汚染率が高く、牛肝臓を生で食べることは免疫力の弱い小児や老人では大きなリスクとなる可能性が

ある。

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願，登録状況

無し

表 1 . 各種消毒薬処理後の部位ごとの肝臓内大腸菌群陽性検体数と陽性率

消毒薬	部位 1 (%)	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5	胆汁
A* [61#]	16 <sup>§</sup> (26)	14 (23)	34 (56)	31 (51)	38 (62)	11 (18)
B** [16]	12 (75)	11 (69)	14 (88)	16 (100)	16 (100)	4/15 <sup>#</sup> (27)
C*** [7]	5 (71)	6 (86)	5 (71)	7 (100)	7 (100)	0/4 (0)
D## [9]	5 (56)	6 (67)	7 (88)	9 (100)	9 (100)	0 (0)

調査時期：\*H27/1-H27/9, \*\*H27/5-H27/8, \*\*\*H27/6-H27/8, ##H27/8-H27/9

#総検体数、§陽性検体数

表 2 . 各種消毒薬で処理後、凍結無、凍結有、凍結後 2 回増菌の細菌陽性検体数と陽性率

消毒薬	部位 1 (%)			部位 2		
	凍結無 <sup>+</sup>	凍結有 <sup>+</sup>	凍結 2 次増菌 <sup>&amp;</sup>	凍結無 <sup>+</sup>	凍結有 <sup>+</sup>	凍結 2 次増菌 <sup>&amp;</sup>
A* [30#]	13 <sup>§</sup> (43)	11 (37)	18 (60)	12 (40)	8 (27)	18 (60)
B** [16]	12 (75)	9 (56)	15 (94)	11 (69)	9/15 <sup>#</sup> (60)	15/15 <sup>#</sup> (100)
C*** [7]	5 (71)	4 (57)	7 (100)	6 (86)	4 (57)	7 (100)
D## [9]	5 (56)	3 (33)	9 (100)	6 (67)	3 (33)	8 (89)

調査時期：\*H27/4-H27/9, \*\*H27/5-H27/8, \*\*\*H27/6-H27/8, ##H27/8-H27/9

#総検体数、§陽性検体数、+大腸菌群細菌、&腸内細菌科菌群

表 3 . 各種消毒薬処理後の肝臓内の部位ごとと胆汁における細菌陽性率

消毒薬	左葉：部位 1 と 2 (%)			右葉：部位 3-5	胆汁
	凍結無 <sup>+</sup>	凍結有 <sup>+</sup>	凍結 2 次増菌 &	凍結無 <sup>+</sup>	凍結無 <sup>+</sup>
A 500 ppm* [18#]	8 <sup>s</sup> (44)	6 (33)	16 (89)	18 (100)	6/14# (43)
A 2,000 ppm* [22]	10 (45)	5 (23)	19 (86)	21 (95)	2/15# (13)
E 400 ppm <sup>ss</sup> [12]	1 (8)	1 (8)	6 (50)	4 (33)	1/10 (10)

#総検体数、<sup>s</sup>陽性検体数、<sup>+</sup>大腸菌群細菌、&腸内細菌科菌群、\*H27/10-H27/12、<sup>ss</sup>H28/1

表 4 . 肝臓内部、表面、胆汁及び肛門組織における *stx* 遺伝子の分布 (0.5 g/1.0 g 相当)

遺伝子	肝臓 [88#]					肝臓表面 [87]	胆汁 [80]	肛門組織 [81]
	部位 1 (%)	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5			
<i>stx1</i>	0 <sup>s</sup> (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3.7)
<i>stx2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4.6)	0 (0)	41 (51)
<i>stx1/2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (25)
合計	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4.6)	0 (0)	64 (79)

#総検体数、<sup>s</sup>陽性検体数

表 5 . 肝臓内部、表面、胆汁及び肛門組織における *stx* 遺伝子の分布 (50 g 相当)

遺伝子	肝臓 (%)			胆汁 [36]	肛門組織 [30]
	左葉 [48#]	右葉 [48]	表面 [48]		
<i>stx1</i>	0 <sup>s</sup> (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10)
<i>stx2</i>	0 (0)	0 (0)	6 (13)	0 (0)	12 (40)
<i>stx1/2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12 (40)
合計	0 (0)	0 (0)	6 (13)	0 (0)	27 (90)

#総検体数、<sup>s</sup>陽性検体数

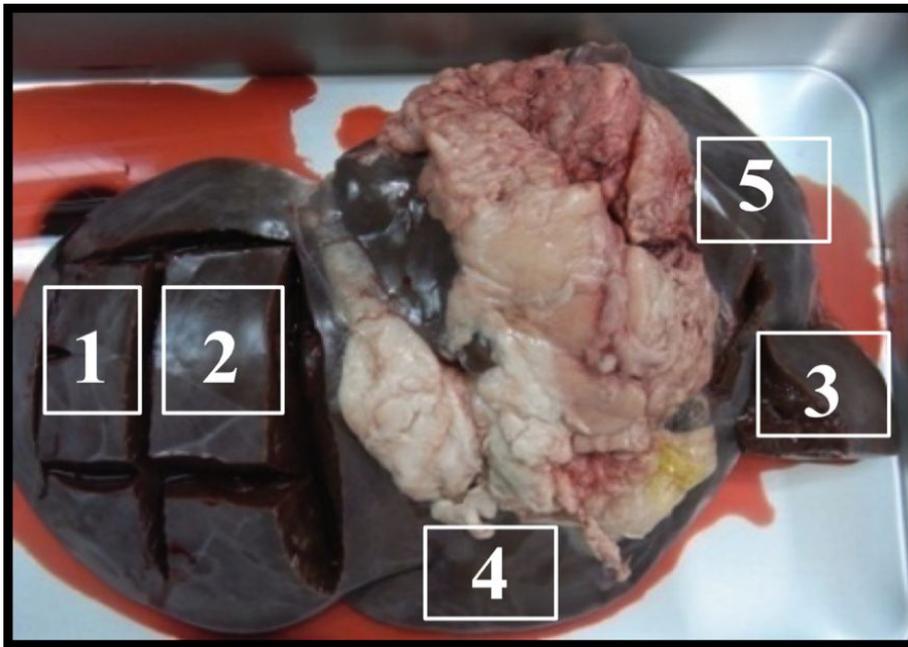


図. 肝臓から採取した部位 1-5 を示す、左葉 (部位 1 と 2)、右葉 (部位 3-5)

平成 27 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 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究所  
研究協力者：川崎 晋 国立研究開発法人 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 *Salmonella* Enteritidis IF03313 株のガンマ線殺菌を行い、 $D_{10}$  値として、凍結(-80 )含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy を得た。また、*Salmonella* を  $10^5$  CFU/g 接種した検体について、目標線量が、6、7、8 kGy となるよう 3 段階の線量のガンマ線を照射した場合、含気条件では 7、脱気条件では 8 kGy で *Salmonella* が非検出となった ( $n=5$ )。抽出法を変更して回収率を向上させた分析法により、冷凍(0 ) 6 kGy、凍結(-80 )10 kGy までの牛肝臓のガンマ線照射における、2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB の生成量を再確認した。

#### 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が設定された。この規制には解除の要望も多かったことから、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<sup>1)</sup>。

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。

本分担研究課題では、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、牛肝臓内部に接種した *Salmonella* Enteritidis IF03313 株の凍結条件でのガンマ線による死滅効果の確認と電子線照射に関する予備試験を実施した。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 (2-ACBs)の生成量について、抽出法を替えて再検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は、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。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。

2-ACBs 定量用の牛肝臓試料は、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) に入れ、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、研究機関が保有する *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を用いた。

供試菌は Trypticase Soy Broth(TSB; Difco)にて 35 一昼夜静置培養した後、遠心分離 (4000 x g, 10 分間) により菌体を収集、培地成分を除去した。おのおの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、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。線量率は約 2.97 kGy/h であった。

正確な吸収線量は模擬試料に装着したアラニンペレット (ES200-2106:ブル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. 牛肝臓のガンマ線殺菌効果確認試験

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  $\mu$ 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 (生残曲線作成用) あるいは  $10^5$  CFU/g 程度 (殺菌効果確認用) 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 × 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、-80 の冷凍庫内で

2 時間以上放置して温度を一定にした後、ガンマ線照射に供した。

生残曲線を作成するための試料は、目標線量として、冷凍下で 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 kGy の線量を照射した。また、殺菌効果確認用の試料は、冷凍条件下で、目標線量、6、7、8 kGy の 3 段階の線量を照射した。

照射後の検体は、解凍後直ちに菌数計測した。

#### 5. 生菌数測定および標的微生物の検出

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 VRBG 平板 (Oxoid) にスパイラルプレーティング法で塗抹した。これらの平板は 35 °C で各々 24 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 *Salmonella* 数を求めた。さらに VRBG 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 *Salmonella* 同定キット (Singlepath *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

別途、殺菌線量を求める実験では、目標線量 (6、7、8 kGy) を照射した後、検体に滅菌緩衝ペプトン水を加えて 10 倍乳剤とした後、35 °C で一昼夜培養した。培養した菌液は標準寒天平板および VRBG 平板 (Oxoid) に一白金耳を各線し、35 °C で一昼夜培養した。出現した集落は、それぞれ釣菌し、イムノクロマト

法による *Salmonella* 同定キット (Singlepath *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *Salmonella* 属であることを確認した。

#### 6. 2-アルキルシクロブタノン分析

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、4 °C の冷蔵庫中で 1 晩放置後、クロロホルム層を集めた。この抽出物の溶媒を留去後、アセトニトリル 2mL に再溶解させた。これを 2 回繰り返して、アセトニトリル溶液を合わせ、-20 °C 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、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 Silica gel 60 70-230 mesh) 2 本に添加し、10 mL のヘキサンで洗浄後、ヘキサン/ジエチルエーテル (98:2) 15 mL で溶出し、その 5-15mL 画分を集めた<sup>2)</sup>。この試料を濃縮して、内部標準物質として、2-cyclohexylcyclohexanone、0.05 µg / mL を含むヘキサン 200 µL に溶解した。この試料を 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 -

テトラセニルシクロブタノン (2-tDeCB)を定量した。なお、検量線は、2-ACBsの標準試料に、非照射の牛肝臓からの抽出精製物を添加したマトリックススタンダードを用いて作成した。

#### <GC-MS 条件>

GC 装置: GC:GC-2101,

検出器: MS:QP2010+ Shimadzu 200

カラム:DB-5MS(60m × 0.25mm 0.25 $\mu$ m) カラム温度:55 (2min) 20 /min 175 , 2 /min 250 , 10 /min 270 (20min)

注入口 250

注入モード:パルスドスプリットレス

注入サンプル量 1 $\mu$ L

モード:EI (70eV) SIM 測定

定量イオン:m/z=98

確認イオン:m/z=112

#### 7. 電子線照射に関する予備試験

電子線照射は、(株)原子燃料工業 NFI 照射サービスに委託し、同社が保有する電子加速装置 Rhodotron (10 MeV 200 kW, IBA 社製)を用いて実施した。

10 MeV 電子の深部線量分布 (depth-dose)を確認するため、比重約 1 g/cm<sup>3</sup> 厚さ約 20 mm の板状こんにゃくを模擬試料とし、4枚重ねにしたこんにゃくに斜めに切り込みを入れ、テープ状の CTA フィルム線量計 (FTR-125 富士フィルム社製)をはさみ、10 MeV、12 mA の電子を照射した。片面照射時の試料厚さは 86.4mm コンベア速度は、5.71 m/min、両面照射時の試料厚さは 81.5

mm コンベア速度は、7.61 m/min であった。CTA フィルムの書く長さ方向の 280 nm における吸光度から、試料表面からの深さ方向における吸収線量 (kGy) を算定した。

殺菌効果の予備試験としては、前項と同様に 25g の肝臓試料に、10<sup>5</sup> CFU/g となるように、*Salmonella* の供試菌株を接種し、ガスバリア袋で包装して凍結 (-80 )した試料を、発泡スチロール製の箱に入れたドライアイスの上に重ならないように並べ、両面から 10 MeV、4 mA の電子で両面照射した。コンベア速度は、目標線量 6、7、8 kGy に対し、それぞれ、13.68、11.73、10.26 kGy/m とした。肝臓試料の照射方向に対する厚みは、10 ~ 15 mm 程度であった。照射条件ごとに、ラジオクロミックフィルム線量計 (FWT-60)を試料表面に装着した常温の肝臓試料を同時に照射し、吸収線量の確認を行った。

#### C. 研究結果および考察

##### 1. 凍結した牛肝臓中での *Salmonella* の殺菌効果

25年度の実験では、*Salmonella* について凍結 (-80 )含気条件で 1.33、脱気条件で 1.21 kGy と得られていたが、既存論文との整合性が取れなかったため、追試を実施した。追試を実施したところ、含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58 kGy と得られ、結果の整合性を確認した。すなわち、本条件下で *Salmonella* 菌数を 1/10<sup>5</sup> とするには含気条件で 7.2、脱気条件で 7.9 kGy が必要と推察された。ただし、こ

れは指数関数型として殺菌されたと仮定した場合の線量であり、シグモイド型による殺菌効果として考えた場合には上記殺菌線量は過大となる可能性も考えられた。このため、規定線量による *Salmonella* の殺菌効果確認試験を試みた。上記の検討結果から、おおよそ 6~8 kGy の照射により、*Salmonella* の菌数を  $1/10^5$  に減少させることが死滅曲線から予想されたため、約  $10^5$  CFU/g となるよう *Salmonella* を接種した検体 (n=5) を作成し、牛肝臓中の線量が 6、7、8 kGy となるような照射した場合の不活性化 (5 log cfu/g 低減の可能性) について検討を行った。その結果、凍結含気包装下においては 7 kGy で、凍結脱気包装下においては 8 kGy で、5 検体中全てから *Salmonella* は非検出となった。本試験にて接種した菌数は  $3.0 \times 10^5$  CFU/g と求められており、これまで作成した死滅曲線から得られた D<sub>10</sub> 値と併せても、妥当な結果と推察された。

牛肝臓中を汚染する可能性のある食中毒起因菌としては、*E. coli* O157、*Campylobacter*、*Salmonella* を本研究では取り上げた。この中で *Salmonella* が最も放射線抵抗性であった。これまで、ユッケに代表される生食用牛肉の規格基準においては、その衛生基準として腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) を指標菌として、これが規定のサンプリング・検査法において陰性であることを規定している<sup>3)</sup>。そこで、殺菌効果の検証に腸内細菌科を想定した際、*Salmonella* より放射線抵抗性が強い腸内細菌科の細菌が存在する可能性について、文献調査を行った。Farkas<sup>4)</sup>の総説によれば、腸内細菌

科細菌の放射線抵抗性は、*Yersinia enterocolitica* < *Shigella* spp. < *Escherichia coli* (O157:H7 を含む) < *Salmonella* spp. の順に大きくなると報告されている。また、2014年に公表された、オーストラリア農務省の調査報告書<sup>5)</sup>に整理された細菌の放射線感受性のデータを参照に、腸内細菌科の D<sub>10</sub> 値を整理すると、*Salmonella* と並んで、*Enterobacter* sp.の放射線耐性が高かった(表3)。*Enterobacter* 属菌について、Osaili ら<sup>6)</sup>は、ブレインハートインフュージョン培地中、加水ミルクパウダー中および、乾燥ミルクパウダー中での *E. sakazakii* ATCC 51329 他5株の D<sub>10</sub> 値はそれぞれ、0.21-0.29 kGy、0.24-0.37 kGy、1.06-1.71 kGy の範囲であったと報告している。また、Lee ら<sup>7)</sup>は、TSB 中および、乾燥ミルクパウダー中での *E. sakazakii* strain ATCC 29544 の D<sub>10</sub> 値をそれぞれ、0.27 及び 0.76 kGy と報告している。細菌の放射線感受性は、同一菌株であっても、照射時の雰囲気、温度あるいは共存物等によっても修飾をうけるため、*Enterobacter* 属菌について既報の D<sub>10</sub> 値だけから、本研究で試験した *Salmonella* との比較において、牛肝臓中での放射線抵抗性について議論することは難しい。しかしながら、*E. sakazakii* についての放射線抵抗性に関する情報を考慮すると、牛肝臓中での *Enterobacter* 属菌の汚染可能性や放射線感受性について、今後さらに検討を要すると考えられる。

## 2. 牛肝臓のガンマ線照射による 2-アルキルシクロブタノン類(2-ACBs)の生成

前年度の研究における 2-ACBs の定量結果では、線量依存的な 2-ACBs の生成を確認したものの、用いた分析法の添加回収率が 59%~68%と低かった。原因として、肝臓中の酵素による 2-ACBs の代謝反応が抽出中に進行する可能性が考えられた。そこで、肝臓を無水硫酸ナトリウムと混和後に高速ホモジナイザーを用いてヘキサンで抽出する方法から、硫酸ナトリウムによる脱水操作を止めてタンパク質が変性しやすいクロロホルム/メタノール溶媒を使って一気に抽出する方法に変更した。その結果、本年度用いた方法での添加回収率は、低濃度添加、2-dDCB および 2-tDCB を 3.3 ng/g FW、2-テトラデセニルシクロブタノン(2-tDeCB)を 8.1 ng/g FW で、 $96.2 \pm 5.7$ 、 $88.3 \pm 2.5$  および  $116.2 \pm 6.0\%$  (n=7)であった。また、高濃度添加として 2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB を 33 ng/g FW、33 ng/g FW、81 ng/g FW で添加した際の回収率は  $79.3 \pm 1.6$ 、 $73.5 \pm 3.1$  および  $77.4 \pm 2.1\%$  (n=7)であった。抽出方法を変更することで、回収率が向上し、回収率の標準偏差も小さくなった。

表 4 に、異なる温度包装条件で照射した際の 3 種の 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、0.88~0.99であった。

肝臓生重量 1g・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。また、-80 照射においては、含気包装時の 2-tDeCB の生成量は脱気包装より有意に大きかった。分析方法の変更により、昨年報告値より、総じてやや高い値が得られたが、これまでの文献値にある他の畜肉での生成量<sup>9),10)</sup>に比べて著しく多量の 2-ACBs が照射牛肝臓中に生成することは無いと判断された。

## 4. 電子線照射に関する予備試験

### 4.1 透過力の確認

放射線照射殺菌では、コバルト 60 ガンマ線のみならず、10 MeV 以下の電子が利用されている。電子線は線量率がガンマ線に比べて著しく大きい、その透過力はガンマ線に比べて劣っている。そこで牛肝臓に対する電子線の照射効果を検討する予備試験として、10 MeV 電子照射時の深部線量分布を確認した。

図 1 に示すように厚さ 86.4 mm(比重 約 1g/cm<sup>3</sup>)の模擬試料に線量計を設置し、上面方向から 10 MeV 電子を照射した際の、線量分布の結果から、図 2 に示すような深度-線量分布曲線を得た。この場合、試料厚さ 86.4 mm は、線量計の長さ 113.9 mm に相当する。図 2 に示すように、片面照射における電子の有効な透過厚さを、試料表面とほぼ同等の線量となる厚さと考え

えると、試料厚さで約 36 mm が片面照射の上限厚さと考えられた。

図 3 に、片面照射時と同様に 4 枚重ねの模擬試料を両面照射した際の深度-線量分布を示す。照射した模擬試料の厚さは、81.5 mm であった。実測した、線量分布から、最大/最小線量比 (Dose Uniformity Ratio) は約 1.5 程度であった。また、図 3 に示したように中央部の線量が表面線量と同等の線量となる厚さを両面照射で透過可能な厚さであるとして、片面照射の深度線量分布のデータから両面照射において透過可能な厚さを推定すると、約 85 mm であった。

#### 4.2 . 殺菌効果の予備試験

前項の結果を参考に、重量 25g、厚み 10 ~ 15 mm 程度の牛肝臓の中心に  $3.1 \times 10^5$  CFU/g の *S. Enteritidis* IFO3313 株を接種して、含気、凍結状態 (-80 ) で 10 MeV 電子を両面から照射した (n=5)。目標線量 6、7、8 kGy に対して、ラジオクロミック線量計で測定した同形のダミー試料の吸収線量は、6.3、7.2、8.2 kGy (両面の平均) であった。含気条件、凍結状態 (-80 ) において 8kGy で、5 検体中全てから *Salmonella* は増菌培養を行っても非検出となった。7 kGy では、5 検体中 3 検体が陽性であった。この結果は、上述したガンマ線における殺菌効果とは一致せず、電子線の効果の方がガンマ線に比べて、やや劣る可能性を示唆している。ガンマ線と電子線の殺菌効果については、同等とするもの<sup>11)</sup>電子線の効率が低いとするもの<sup>12)</sup>、ガンマ線の効率が低いとするもの<sup>13)</sup>など、異なる傾向が報告されている。ただし、これらの差異は極

端なものではなく、また、殺菌効率の異なる理由も線量率の違いや、照射時の環境の影響の可能性も考察されておりガンマ線、電子線の作用が本質的に異なるとは解釈されていない。牛肝臓の電子線照射については、今後、標的菌株の生残曲線を作成しての  $D_{10}$  値の算出など、さらに詳細に検討する必要がある。

#### D. 結論

牛肝臓内部に接種した *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株のガンマ線殺菌を行い、 $D_{10}$  値として、凍結 (-80 ) 含気条件で 1.43、脱気条件で 1.58kGy を得た。また、*Salmonella* を  $10^5$  CFU/g 接種した検体について、目標線量、6、7、8 kGy となるよう 3 段階の線量のガンマ線を照射した場合、含気条件では 7、脱気条件では 8 kGy で *Salmonella* が非検出となった (n=5)。

抽出法を変更して回収率を向上させた分析法により、冷凍 (0 ) 6 kGy、凍結 (-80 ) 10kGy までの牛肝臓のガンマ線照射における、2-アルキルシクロブタン類 (2-ACBs)、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB の生成量を再確認した。

#### 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) Kitagawa, Y., *et al.*, A Rapid and Simple Method for the Determination of 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Meat and Processed Foods.

- Food Analytical Methods* 7(5), 1066-1072, (2014).
- 3) 厚生労働省：生食用食肉の腸内細菌科菌群の試験法について,食安発0926第1号 平成23年9月26日
- 4) J. Farkas, C. Moha'csi-Farkas, *Trends in Food Science & Technology*, 22, 121-126 (2011).
- 5) Australian Department of Agriculture (2014), Gamma irradiation as a treatment to address pathogens of animal biosecurity concern, Department of Agriculture, Canberra, pp 95-96 Table9.
- 6) Osaili, T.M., *et. al.* Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula by gamma irradiation: determination of D10-value. *J Food Sci* 72, M85–M88 (2007).
- 7) LEE J. W. *et.al.*, Gamma Radiation Sensitivity of *Enterobacter sakazakii* in Dehydrated Powdered Infant Formula, *Journal of Food Protection*, Vol. 69, No. 6, 1434–1437(2006).
- 9) 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).
- 10) 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/NCLCollectionStore/\\_Public/41/072/41072628.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/41/072/41072628.pdf).
- 11) Tallentire, A. and Miller, A, A comparison of the microbicidal effectiveness of gamma rays and high and low energy electron radiations., *Radiation Physics and Chemistry*, 79, 701–704 (2010).
- 12) Katheleen, T. *et. al.* Effect of Gamma or Beta Radiation on *Salmonella* DT 104 in Ground Pork, *Journal of Food Protection*, 69(6), 1430–1433 (2006)
- 13) Qian, J. *et. al.*, Effects of gamma and electron beam irradiation on the microbial quality of steamed tofu rolls., *Radiation Physics and Chemistry*, 82, 119–121 (2013).
- F. 健康危機情報  
なし
- G. 研究発表  
論文発表  
なし  
講演・研修会等  
1. 川崎晋, 持田麻里, 等々力節子, 五十君静信. ガンマ線照射による牛肝臓・挽肉中での腸管出血性大腸菌の殺菌効果、第19回腸管出血性大腸菌研究会(東京), H27/7/9-10.
- H. 知的財産権の出願, 登録状況  
なし

表 1. 牛肝臓中における *S. Enteritidis* IFO3313 株のガンマ線照射による殺菌効果

-80°C	D <sub>10</sub> 値 (kGy)	
	含気	脱気
牛肝臓	1.43	1.58

表 2. 牛肝臓中において *S. Enteritidis* IFO3313 株を  $3.0 \times 10^5$  CFU/g 接種した検体に 6, 7, 8 kGy の線量を照射した際の検出結果 (n=5)

牛肝臓	6.0kGy	7.0kGy	8.0kGy
含気	5/5	0/5	0/5
脱気	5/5	2/5	0/5

表 3 . 主な腸内細菌科細菌の D10 値

細菌名	D10 値 (kGy)
<i>E coli K99</i>	0.02
<i>E coli</i>	0.04 - 0.70
<i>Enterobacter sp.</i>	0.36 - 1.5
<i>Klebsiella species</i>	0.4 - 0.45
<i>Proteus mirabilis</i>	0.24 - 0.5
<i>Proteus vulgaris</i>	0.07
<i>Salmonella anatum</i>	0.45 - 0.67
<i>Salmonella dublin</i>	0.02
<i>Salmonella Enteritidis</i>	0.25 - 0.7
<i>Salmonella Gallinarum</i>	0.13 - 0.56
<i>Salmonella Heidelberg</i>	0.33
<i>Salmonella Meleagridis</i>	0.93
<i>Salmonella Panama</i>	0.41 - 0.66
<i>Salmonella Paratyphi</i>	0.19 - 1.07
<i>Salmonella Senftenberg</i>	0.13 - 1.34
<i>Salmonella Stanley</i>	0.61 - 0.78
<i>Salmonella Typhi</i>	0.2 - 0.78
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0.1 - 1.58
<i>Serratia marcescens</i>	0.02 - 0.1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.04 - 0.38

Australian Department of Agriculture (2014),  
 Gamma irradiation as a treatment to address pathogens of animal biosecurity  
 concern, Department of Agriculture, Canberra , pp 95-96 Table9 より作成

<http://www.agriculture.gov.au/biosecurity/risk-analysis/reviews/final-animal/ba-2014-13-gamma-irradiation>

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

照射条件	dDCB (ng/g FW)	tDeCB (ng/g FW)	tDCB (ng/g FW)
脱気包装 0			
3 kGy	4.26 ± 0.33	6.34 ± 1.13	9.92 ± 0.69
6 kGy	7.67 ± 0.66	15.50 ± 0.46	20.8 ± 1.83
含気包装 0			
3 kGy	4.72 ± 0.33	6.54 ± 0.09	10.2 ± 0.30
6 kGy	7.43 ± 0.16	14.9 ± 0.8	22.3 ± 0.5
脱気包装 -80			
5 kGy	4.93 ± 0.25	20.1 ± 2.1	13.2 ± 1.0
10 kGy	10.1 ± 0.23	44.7 ± 1.0	30.4 ± 1.3
含気包装 -80			
5 kGy	4.88 ± 0.14	21.4 ± 1.6	13.2 ± 0.2
10 kGy	10.3 ± 0.30	55.5 ± 1.6	30.7 ± 0.5
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			
脱気包装 0	1.3	2.5	3.4
含気包装 0	1.3	2.4	3.7
脱気包装 -80	1.0	4.4	3.0
含気包装 -80	1.0	5.3	3.0

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			
脱気包装 0	0.33	0.41	0.44
含気包装 0	0.32	0.40	0.46
脱気包装 -80	0.26	0.72	0.38
含気包装 -80	0.26	0.87	0.38

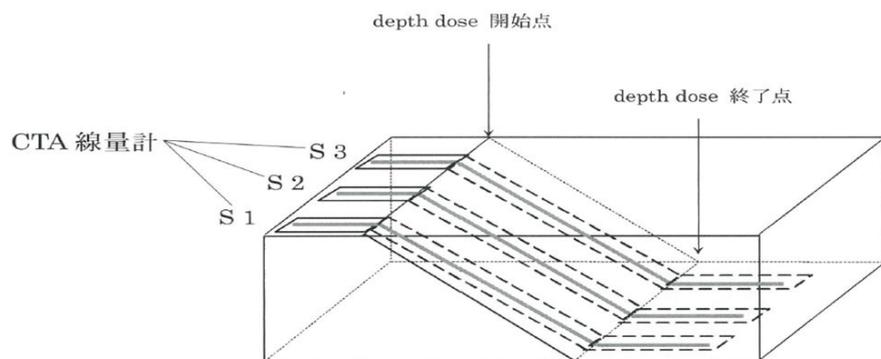


図1. 電子線片面照射時の線量計配置図

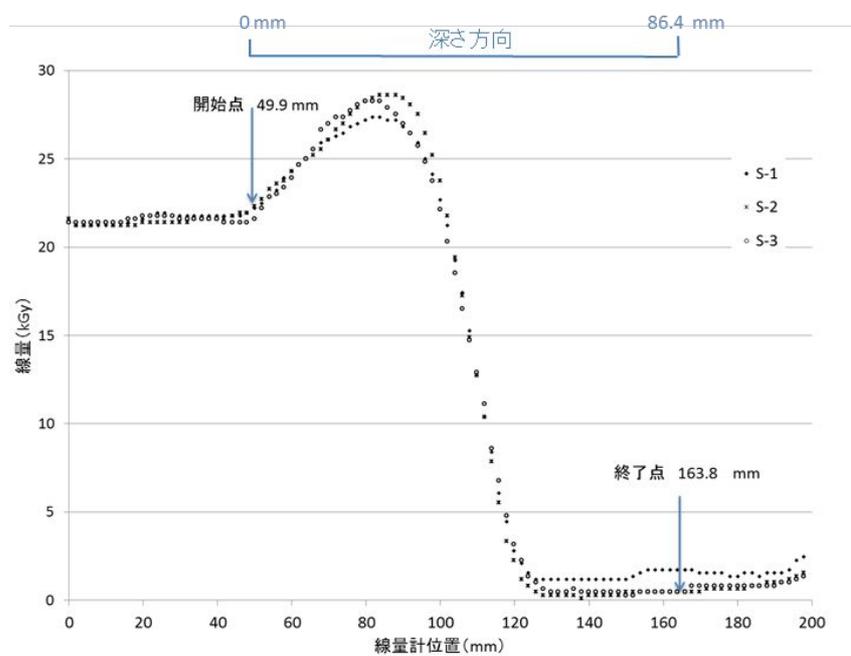


図2. 10 MeV 電子 片面照射における線量深度分布

x 軸は図1のように配置した線量計の長さ位置を表している。  
 実際の深さ距離は図中の開始点位置 (49.9 mm) を 0 mm (試料最上面)、  
 終了点位置 (163.8 mm) を 86.4 mm (試料最下面) として補正される。

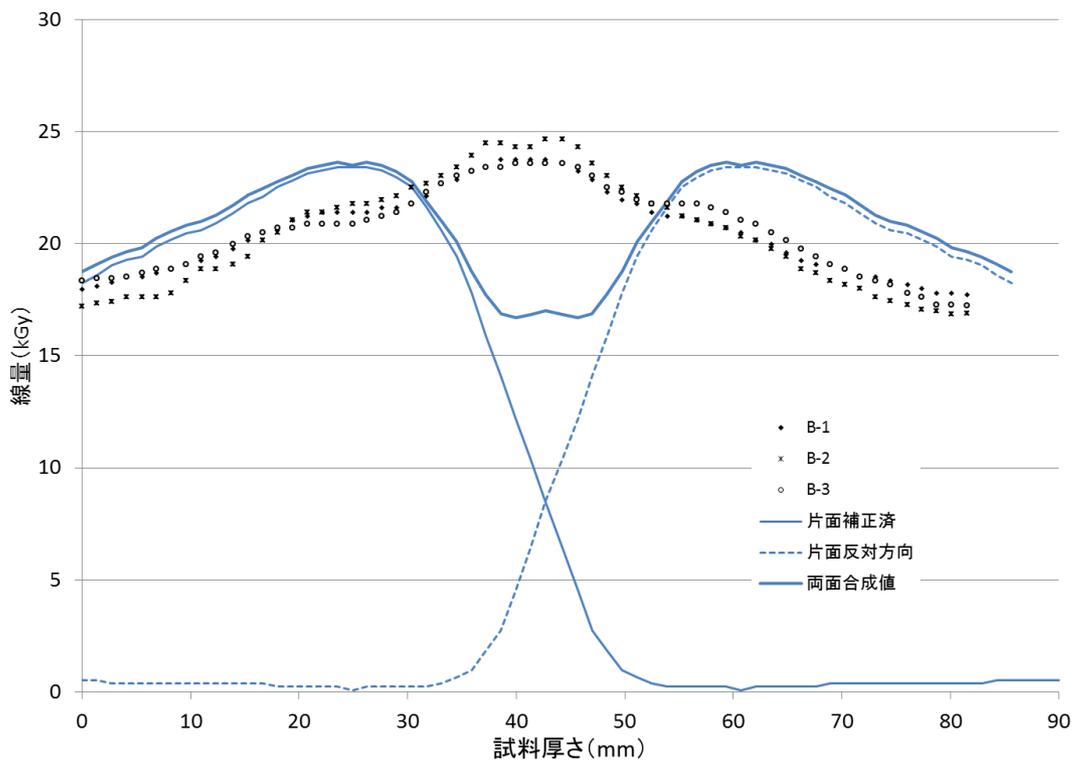


図3. 10 MeV 電子 両面照射における線量深度分布 (試料厚さ:81.5 mm)

x 軸は試料表面(照射方向に向かって最上面)からの試料厚さを表す。  
 プロットは、図1のように3本のテープ状線量計を厚さ 81.5 mmの試料に取り  
 付け両面照射(試料の表裏を反転させて1回ずつ照射)した際の実測値  
 実線(細)は、図2で得た片面照射の深度線量分布曲線の最上面(表面)線量を両  
 面照射時の最上 面線量と同等になるように補正して描画したもの。点線はこ  
 れを反対方向から照射と仮定し、厚さ方向の座標を反転させて描画したもの。  
 実線(太)は両者を合成し、片面照射の深度分布曲線から、厚さ 85.6 mmの試  
 料の両面照射時の線量分布をシミュレーションしたもの。

平成 27 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

高圧処理による鶏ササミ中の食中毒原因菌の不活化に関する検討

分担研究者 岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 吉田 麻利江 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究者 荻原 博和 日本大学生物資源科学部

研究要旨：鶏肉の生食及び不十分な加熱状態での喫食による健康被害は、日本国内でしばしば起こっており、その防止手法の確立が求められている。本研究では、非加熱殺菌法のひとつである高圧殺菌法を用いて、鶏ササミ中の食中毒原因菌の低減について検討した。過去の報告で牛内臓の高圧処理に用いられ、有効とされた 300MPa 5 分間の処理を 6 回反復する処理により、鶏ササミに接種したサルモネラが 2~5log の低減を示し、カンピロバクターでは 7log 以上が低減し、定量法では検出限界以下となった。今回の処理条件においては、肉色は白化する傾向を示した。サルモネラにおいて、高圧処理後の発育集落数は選択分離培地と非選択培地上で異なっている場合が見られ、高圧処理により損傷菌が発生していると思われた。以上の結果から、高圧処理により鶏ササミ中の食中毒菌の菌数低減が可能であり、特にカンピロバクターに高い効果を示したが、高圧処理後の鶏肉を生食用として提供することを可能とするには、サルモネラに対する殺菌効果を高めると共に、肉質の変化を最小限にとどめうる条件の検討が必要と思われた。

#### A. 研究目的

鶏肉による食中毒は、サルモネラ及びカンピロバクターを原因菌とするものが中心となっている。市販鶏肉におけるカンピロバクターの汚染率は 2008 年の調査で 41.8%、サルモネラは 46.7%と高率であり、現在食中毒事件数で 1, 2 位を占めるカンピロバクター食中毒と、サルモネラ食中毒の発生を減らすには、それらの原因食品となることが多い鶏肉の汚染低減が重要である。しかしながらこれらの細菌は、鶏肉の表面のみならず内部にも存在していることが知られており、食鳥処理

における衛生管理の向上のみでは、汚染率の低減は困難と思われる。本来これらの細菌は、加熱により死滅するものであるが、菌が内部にも存在しているため、加熱不十分な鶏肉の喫食による食中毒事例がしばしば起こっている。更に、一部国民の生食嗜好により、鶏肉やその内臓肉を刺身やたたきとして生食または部分的な加熱のみで喫食することによる食中毒事例も多発している。鶏肉の喫食、特に生食による食中毒発生を減少させるためには、これらの病原菌に対し加熱によらない殺菌を行い、感染リスクの低減を図る必要がある。

非加熱殺菌法には、放射線、高電圧パルス、パルス光等があるが、なかでも静水圧を利用した高圧処理は、果実等の生の香り、色、風味が保持されるとして、近年注目を集めている。初年度及び昨年の本研究では、牛肝臓に添加した大腸菌の高圧処理による不活化の検討を行った。初年度の検討では400MPa及び500MPaの処理により5logの低減が可能であった。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。次年度は、250MPa180分の処理による肝臓中の*E. coli*への不活化効果と、肝臓の肉色及び肉質に及ぼす影響について検討を行ったところ、肝臓の変化は抑えられたものの、菌数の低減は2logにとどまった。今年度は、300MPa5分を6回反復する高圧処理条件による、鶏ササミ肉に人工的に接種したサルモネラ及びカンピロバクターへの菌数低減効果について検討した。

## B. 研究方法

### (1) 供試菌株

*Salmonella* Typhimurium LT2 株と *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 株を用いた。サルモネラ菌株は-80℃に保存し、Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地に植え、単一集落を BHI 液体培地に接種して 37℃で 20-24 時間培養したものを添加試験に供した。カンピロバクター菌株は-80℃に保存し、Muller Hinton (MH) 寒天培地上でアネロパック及び嫌気ジャーを用いて 37℃で 2 代培養したものを、MH 液体培地に懸濁した菌液を添加試験に用いた。

### (2) 検体

高圧処理を行う食品検体は、市販の鶏ささみ肉を用いた。接種試験用の検体は 10g 片に切断し、滅菌した高圧処理用袋に分包後、調整菌液を接種した。バキュームシーラーを用いて袋をシールしたのち、滅菌蒸留水を入れた外袋内で更にシールして密封した。硬度及び色彩を測定する検体と病

理組織学的検索に用いる検体は、1本のササミを滅菌済み高圧処理用袋に入れて密封したのち、滅菌蒸留水と共に外袋に密封した。

### (3) 高圧処理

高圧処理は、上記の二重包装済み検体を、TSF6-50 (東洋高圧)を用いて 300MPa、5分を6回反復する条件で行った。処理温度は 10℃から 20℃の範囲であった。

### (4) 菌数測定

カンピロバクターに対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を 4 倍量の MH 液体培地中で 5 倍乳剤を作成し、各 100µl を MH 寒天平板及び CCDA 寒天平板に塗布後、MH 培地は 37℃、CCDA 培地は 42℃にてアネロパック及び嫌気ジャーを用いた微好気培養を行い、48 時間後に定型集落の計数を行った (定量試験)。また、一部検体を Bolton 培地で処理し、37℃で 4 時間、41.5℃で 44 時間微好気培養後に CCDA 培地に塗布し、42℃48 時間培養後に定型集落の確認を行った (定性試験)。サルモネラ属菌では、高圧処理後の検体を 4 倍量の滅菌生理食塩水中でストマッカー処理して 5 倍乳剤を作成し、各 100µl を BHI 寒天平板及び CHROMagarSalmonella 平板に塗布後、37℃で好気培養を行い、48 時間後に定型集落の計数を行った (定量試験)。また、5 倍乳剤の残りは 37℃で 18 時間前増菌培養後、RV 培地に接種して 42℃22 時間増菌培養ののち、CHROMagarSalmonella 平板に塗布する定性試験を実施した。定量試験では、平板に発育した定型集落数と希釈倍率から、高圧処理前及び処理後の検体中の菌数を算出した。

### (5) 硬度及び色調

高圧処理による鶏ササミ肉の硬度及び色調の変化を測定するため、菌を接種しないササミ検体に (3) と同様の高圧処理を行った。未処理、300MPa

5分の高圧処理を1回、3回及び6回かけた検体について、レオメーターTP-10（ヤマデン）を用いて硬度を、色差系（コニカミノルタ）を用いて色調を計測した。

#### (6) 病理組織学的検索

(5) と同時に高圧処理した検体を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。作成した病理組織標本を光学顕微鏡で観察し、高圧処理による組織の変化を観察した。

### C. 結果

#### 1. 高圧処理による鶏ササミ中に接種したサルモネラとカンピロバクターへの菌数低減効果

300MPa、5分6回反復の高圧処理を行った結果の菌数を図1及び2に示した。高圧処理は3回実施し、平均及び標準偏差を求めた。

高圧処理前の鶏ササミにおけるサルモネラ及びカンピロバクターの菌数は、約 $1.04 \times 10^8$ CFU/g及び約 $7.2 \times 10^7$ CFU/gであった。高圧処理後のサルモネラ菌数は、非選択培地であるBHI培地上に形成された集落数で、1回目が $8.5 \times 10^2$ CFU/g、2回目が $1.05 \times 10^6$ CFU/g、3回目が $9 \times 10^2$ CFU/gであった(図1)。3回の試験のいずれにおいても、BHI培地上の集落数は、選択分離培地であるCHROMagarSalmonella上の集落数よりも多く、高圧処理により損傷菌が発生している事が示された。高圧処理後のカンピロバクター菌数は3回の処理全てにおいて、菌が検出されず、検出限界以下となった(図2)。但し、データは示していないが、いずれにおいても増菌培地を用いた定性試験においては、高圧処理後の検体からカンピロバクターが検出された。

#### 2. 高圧処理が鶏ササミの色調と硬さに及ぼす影響

300MPa、5分の高圧処理による鶏ササミの肉色及び硬さの変化を測定した結果を表1及び2に、写真を図3に示した。未処理の鶏ササミの肉色は、明るさを示すL値が14.5、赤みを示すa値が2.3、黄色みを示すb値が6.3であった。300MPaの高圧処理の反復を行うと、1回の処理でL値が22.8となり、3回及び6回の処理においても1回目を超える値を示し、高圧処理の反復により、色調の明るさが増す結果となった(表1)。一方a値は高圧処理により、未処理のものよりも小さい値となり、高圧処理により赤みが失われることが示された。b値は高圧処理により数値が上昇していた。いずれの値も、処理回数に比例しての増加ではないものの、1回の処理で色調の変化を起こすことが示され、肉眼的な観察と相関する数値となった。硬さについては、最大破断点の加重により評価したところ、未処理のササミでは7.54065Nであったものが、1回の高圧処理により9.29252N、3回の処理で8.57844Nとなり、6回の処理後には12.55822Nの値を示し、実際の触感と高い相関を示していた(表2)。

#### 3. 組織学的検索

300MPa、5分の高圧処理による鶏ササミの組織学的変化を図4、5に示した。

高圧処理を行っていない鶏ササミでは筋線維が密に存在しているのに対し、1回でも高圧処理をかけた鶏ササミでは、筋線維の分布が疎となっていた(図4)。筋線維のそれぞれが若干縮小しており、筋線維間には好酸性の微細な線維状物質が認められた(図5)。

#### D. 考察

鶏ササミ中のサルモネラ及びカンピロバクターの、高圧処理による不活化を検討した。過去の論文において、高圧条件を300MPaに設定し、5分間の処理を6回反復させることにより、同じ圧力で30分連続の処理を行うよりも高い殺菌効果が

得られるとされており、同様の条件での検討を実施した。その結果、カンピロバクターに対しては7log削減という高い菌数低減効果を示した。また、3回の試験におけるばらつきも見られなかった。増菌培養により菌が検出されたため、完全な除菌には至らなかったものの、今回の条件が鶏肉中のカンピロバクター削減に効果的であることが示された。一方サルモネラに対しては、平均して3logの削減にとどまり、試験間のばらつきも大きかった。また、サルモネラについては損傷菌の発生が見られたことから、処理後の保存条件によってはより多くの菌が蘇生する可能性があると思われた。これらの結果から、本菌がカンピロバクターよりも高圧処理に対する抵抗性が高く、今回の高圧条件はサルモネラに対しては効果が限定的であることが明らかとなった。一方、肉質の変化については、高圧処理により肉色に変化しており、硬さも増加して、6回の処理を行ったものについては、加熱処理したものと類似した肉質となっていた。以上の結果から、鶏ササミにおいて十分な殺菌効果を確保しつつ肉質変化を最低限に抑えた実用的な高圧処理条件を見いだすには、圧力条件と処理回数の組み合わせを変えた検討、高圧処理後の保管温度による生残性等の検討を追加する必要がある、生食用としての提供には、更なる検討が必要であるが、最終的な包装形態で殺菌処理を行うため、処理以後の工程で微生物汚染を受ける

ことなく流通が可能な高圧殺菌は、畜産食品における衛生保持や品質保持期限の延長に有用であると思われる。

#### E. 結論

鶏ササミに人工的に添加した食中毒原因菌の高圧処理による不活化を検討したところ、300MPaで5分を6回反復する処理により、カンピロバクターは7log、サルモネラは2-5logの菌数低減が可能であった。一方、鶏ササミの肉質については、高圧処理により色調や硬さに変化が見られたため、生食用としての提供を可能にするには更なる条件検討が必要と思われた。

#### 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

図1. 高圧処理による鶏ササミ中のサルモネラ菌数の変化

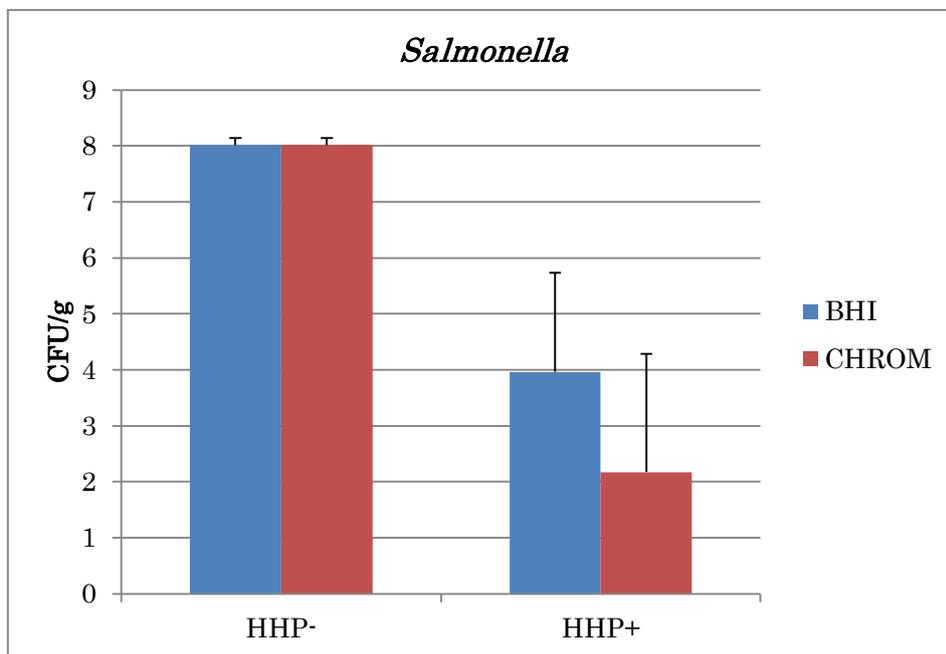


図2. 高圧処理による鶏ササミ中のカンピロバクター菌数の変化

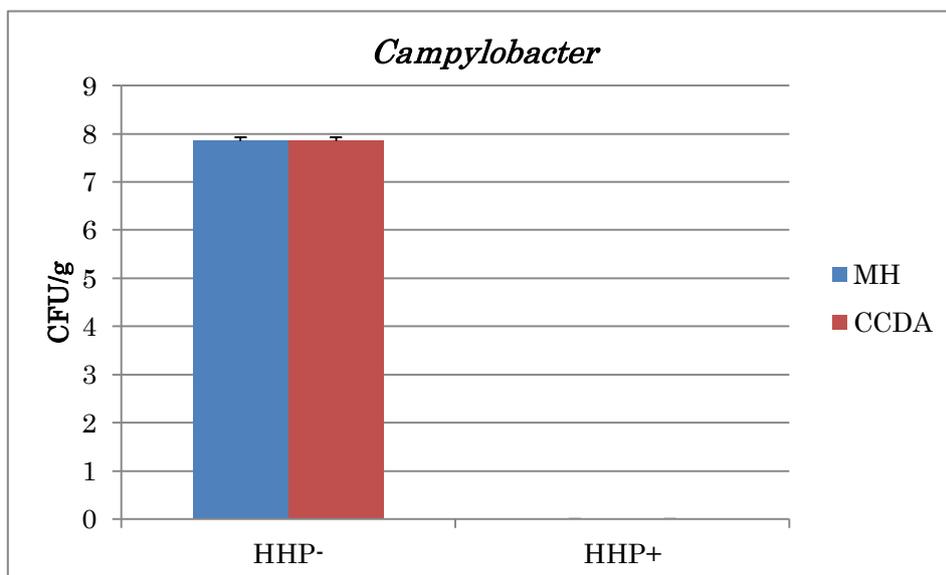


図3. 高圧処理による鶏ササミ肉色の変化

0回



1回



3回



6回



表 1. 高圧処理による鶏ササミの色調の変化

	L 値	a 値	b 値
0 回	14.5	2.3	6.3
1 回	22.8	1.7	8.0
3 回	25.3	1.8	7.0
6 回	23.4	2.1	7.1

表 2. 高圧処理による鶏ササミの硬さの変化

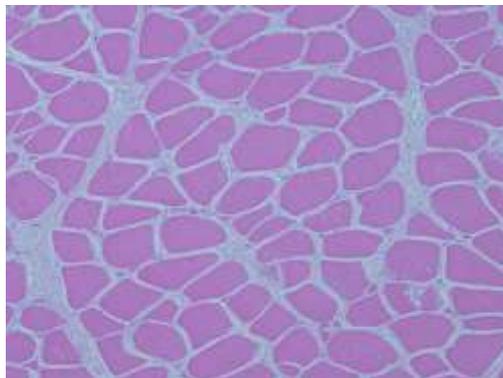
	荷重[N]
0 回	7.54065
1 回	9.29252
3 回	8.57844
6 回	12.55822

図 4. 高圧処理による鶏ササミの組織学的変化

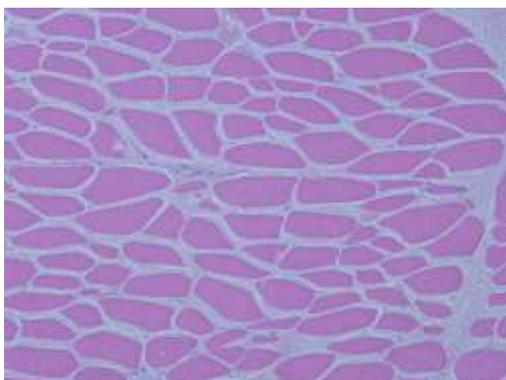
0回



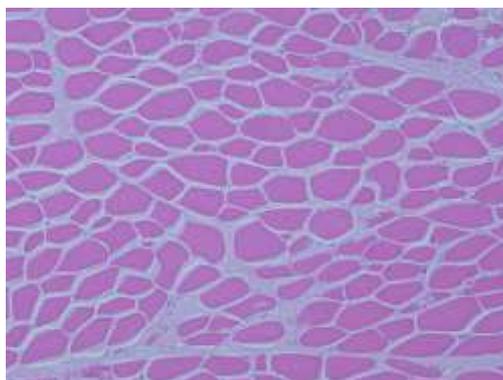
1回



3回



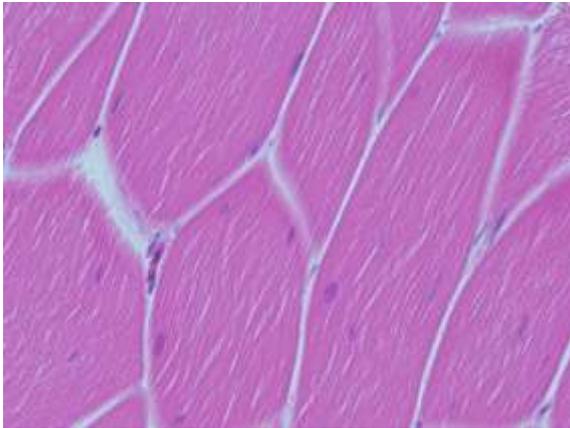
6回



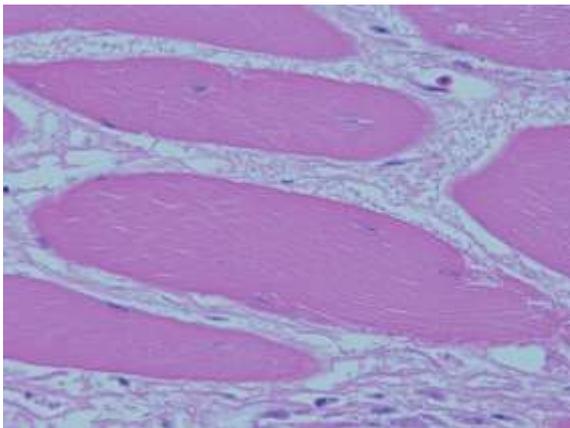
100μm

図5. 高圧処理による鶏ササミの組織学的変化 (強拡大図)

0回



6回



—  
20μm

平成 27 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」

分担研究報告書

分担研究：高圧処理による牛肝臓の超微細形態学的変化に関する検討

研究協力者 鈴木穂高 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 主任研究官

研究協力者 道下正貴 日本獣医生命科学大学 獣医学部 講師

研究協力者 畠山仁 日本獣医生命科学大学 獣医学部 助教

研究分担者 荻原博和 日本大学生物資源科学部 教授

研究分担者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長

## 研究要旨

平成 25 年度の「高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関する検討」において、高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関して検討を行った結果、高圧処理をした肝臓では肝細胞の索状配列や小葉構造などにはほとんど変化が見られなかったものの、肝細胞細胞質の染色性が全体的に低下し、細胞質内に好酸性の小顆粒が見られる、血管内に好酸性の顆粒状構造物が認められるなどの変化が観察された。そこで、本年度は、高圧処理を行った牛肝臓の超微細形態学的変化について検討した。

高圧処理を行った牛肝臓においては、細胞質のミトコンドリア内部に球状の無構造な凝集物の蓄積や、核の周囲に存在する粗面小胞体の不明瞭化などの変化が認められた。このような変化は処理圧が高くなるほど顕著となった。このような肝細胞の超微細形態学的変化は高圧処理による牛肝臓の硬さの変化と関連していると考えられた。

## A．研究目的

平成 25 年度の「高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関する検討」では、高圧処理した牛肝臓について光学顕微鏡観察を行った。その結果、高圧処理をした肝臓では、肝細胞の索状配列や小葉構造などにはほとんど変化が見られなかった。しかし、肝細胞細胞質の染色性が全体的に低下しており、細胞質内に好酸性の小顆粒や、血管内に好酸性の顆粒状構造物が認められるなどの変化が観察された。このような形態の変化、および高圧処理した牛肝臓の硬

さの変化との関連についてより詳細な検討を行うため、本分担研究では、高圧処理した牛肝臓の電子顕微鏡を用いた超微細形態学的変化を検討した。

## B．研究方法

高圧処理方法は、平成 25 年度の報告書にある「高圧処理による牛肝臓中の *Escherichia coli* の不活化に関する検討」ならびに「高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関する検討」と同様である。すなわち、牛の肝臓（芝浦臓器より購入）を長

方形（横 2cm×縦 3cm、厚さ 0.5cm 程度で重量 10g 程度）のブロックにカットしたものを作製した。これらをプラスチックバックに入れ、シーラーでシールを行った。さらにプラスチックバックに入れ、二重にした状態で高圧処理検体を作製した。

これらを高圧処理装置に設置し、次の処理圧力 200、300、400、500MPa で 10 分間の高圧処理を行った。処理後の検体については 1mm 角ほどに細切し、固定後、定法に従って電子顕微鏡による観察を行った。

#### C．研究結果

高圧処理後の牛肝臓の電子顕微鏡写真を Fig.1～3 に示す。高圧処理を行った牛肝臓では、細胞質のミトコンドリア内部に球状の無構造な凝集物が蓄積しており (Fig.1)、その大きさは圧力の増加に伴い、増大していく様子が見られた (Fig.2)。また、核の周囲に存在する粗面小胞体については、処理圧が高くなるほど不明瞭となっていた (Fig.3)。

#### D．考察

高圧処理後の牛肝臓の電子顕微鏡観察において認められたミトコンドリア内部の凝集物はミトコンドリア基質タンパクの変性によるものと考えられた。また、こ

のようなミトコンドリアの変化は、光学顕微鏡観察において認められた細胞質内の好酸性小顆粒に対応しているものと考えられた。

#### E．結論

本分担研究では、高圧処理による牛肝臓の形態学的変化に関して検討を行った。その結果、光学顕微鏡による観察において認められた細胞質内の好酸性小顆粒がミトコンドリアの変性によって生じた変化であることを明らかにした。

高圧処理を行った牛肝臓の硬さの変化は、肝細胞の索状配列や小葉構造などの肝臓の組織構造の変化によるものではなく、細胞内の微細構造の変化に起因するものであると考えられた。

#### F．健康危険情報

なし

#### G．研究発表

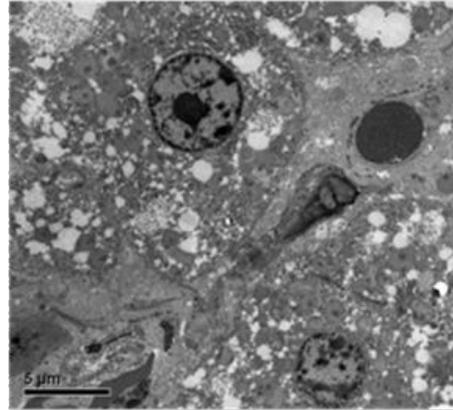
なし

#### H．知的財産権の出願・登録状況

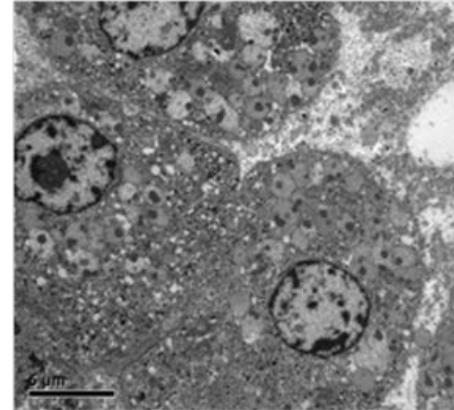
なし

Fig. 1 高圧処理後の牛肝臓の電顕写真(肝細胞の超微細構造)

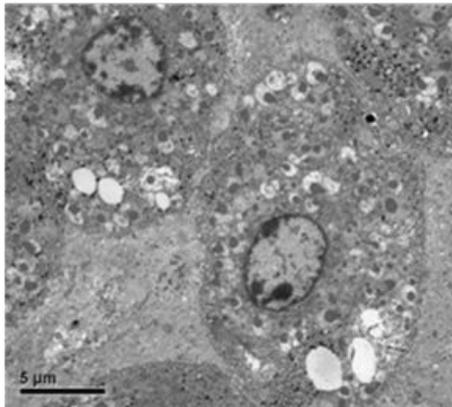
0.1MPa



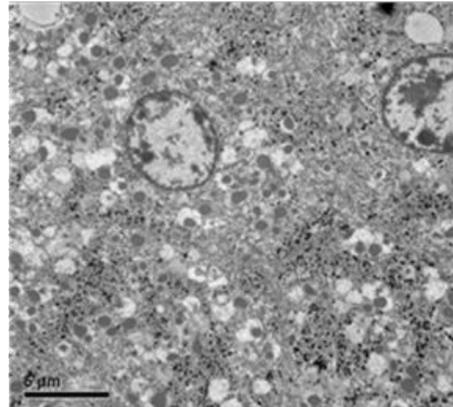
200MPa



300MPa



400MPa



500MPa

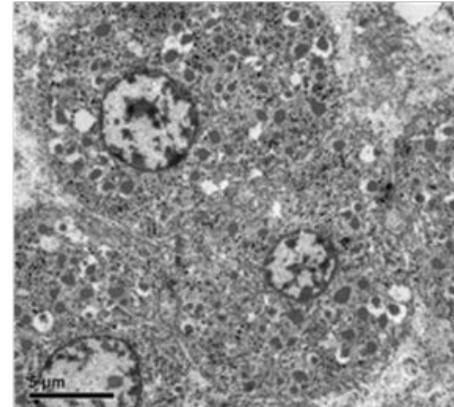


Fig. 2 高圧処理後の牛肝臓の電顕写真(ミトコンドリアの変化)

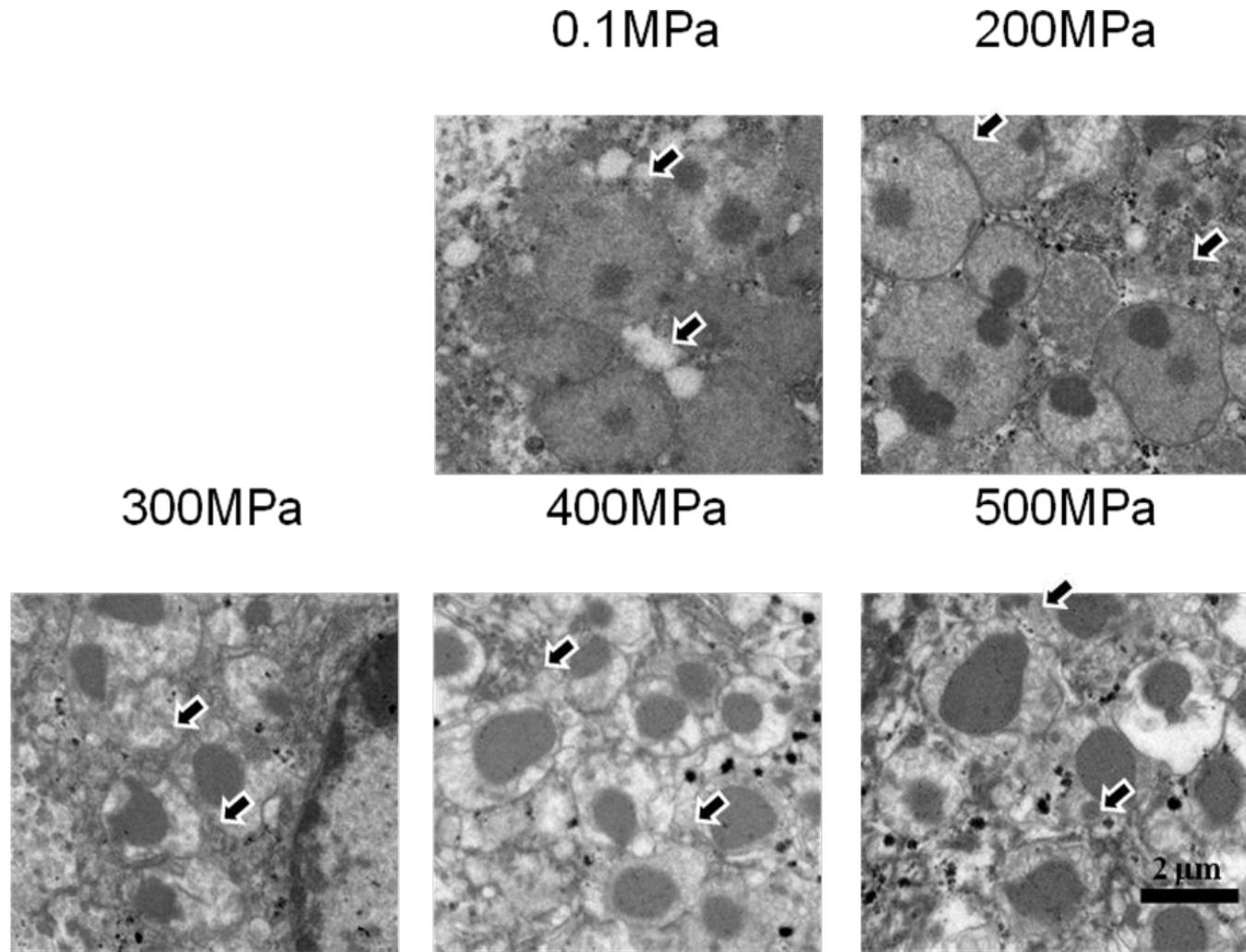
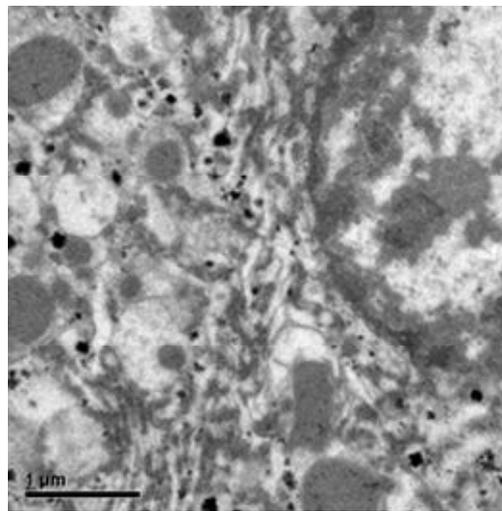
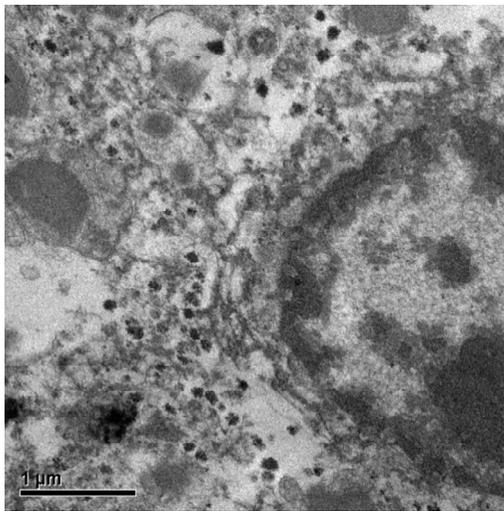
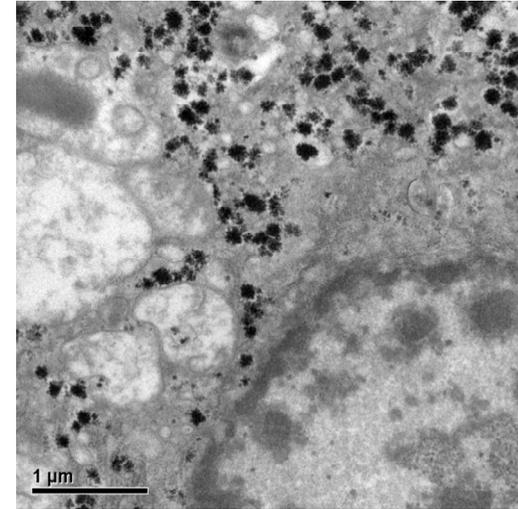
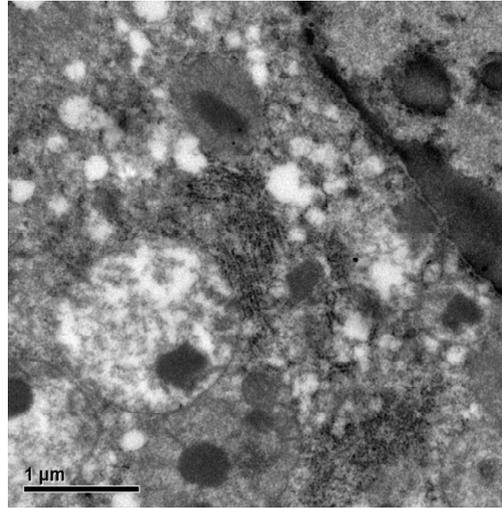
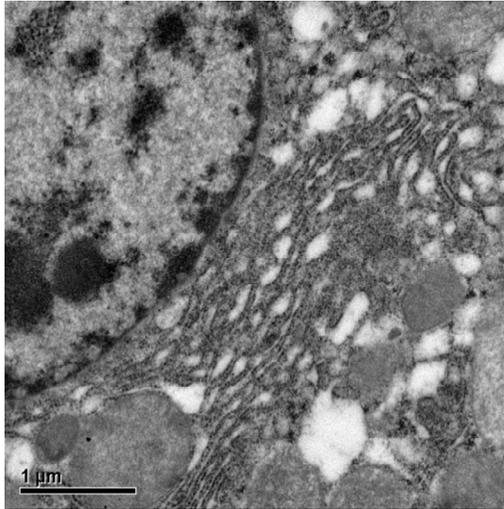


Fig. 3 高压処理後の牛肝臓の電顕写真(粗面小胞体の変化)



高压処理条件

0.1MPa	200MP a	300MP a
400MP a	500MP a	

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
鎌田洋一	わが国における寄生虫性食中毒の発生状況 厚生労働省食中毒統計からの解析	食品衛生研究	65	25 - 31	2015

講演発表

発表者氏名	演題名	発表学会名	発表時期
川崎晋, 持田麻里, 等々力節子, 五十君静信.	ガンマ線照射による牛肝臓・挽肉中での腸管出血性大腸菌の殺菌効果	第 19 回 腸管出血性大腸菌研究会	H27/7/9-10