

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 25-27 年度 総合研究報告書

( 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 25-27 年度総合研究報告書	
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	
． 総合分担研究報告書	
1. 諸外国における食肉の生食実態及び衛生管理実態に関する調査	35
岡田 由美子、五十君静信	
2. 畜産食品における寄生虫性危害に関する研究	39
鎌田 洋一、白藤 由紀子、佐藤 弘隆、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	55
山崎 伸二、日根野谷 淳	
4. 放射線照射による微生物除去	71
等々力 節子、川崎 晋、都築 和香子	
5. 高圧処理による畜産食品中の食中毒原因菌の不活化に関する研究	83
荻原 博和、岡田 由美子、鈴木 穂高、吉田 麻利江、阿部 申、道下 正貴、 畠山 仁	

平成 25-27 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

畜産食品の生食による健康被害の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、3年間の研究を実施した。危害分析として、日本国内での牛の消化管各部位における大腸菌群及び病原性大腸菌の汚染実態、国内の寄生虫性食中毒の実態把握、シカ肉及び牛肉における住肉胞子虫の寄生実態、諸外国における畜産食品の生食実態及びその管理手法についての情報収集を実施した。低減手法としては、非加熱殺菌法である放射線照射、消毒薬による殺菌及び高圧殺菌を用いた検討を行った。

食肉処理場で処理された牛の肝臓のうち、採取した部位により大腸菌群の陽性率に差が見られた。また、汚染菌数及び汚染率には季節変動が見られ、夏場に高く冬場に低い傾向が見られた(夏場:32-81%、冬場:13-50%)。かつて生食用として利用されていた部位の汚染状況は比較的低く、その汚染菌数は最大で $10^6$ CFU/g程度であった。胆汁中の大腸菌群菌数が高かった個体では、肝臓中の大腸菌群菌数も高い傾向が見られたが、肝臓中の汚染が見られる検体で胆汁中の汚染が陰性の例も見られた。腸管出血性大腸菌の指標とした *stx* 遺伝子の検出では、肝臓表面と生食用としては提供されていなかった肝臓部位の内部からは陽性検体が見られたが、生食用として提供されていた肝臓部位の内部からは検出されなかった。

流通している野生のエゾシカにおいては50検体中48検体(96%)が住肉胞子虫陽性であり、高率に汚染されていることが明らかとなった。病畜として搬入された牛6頭について住肉胞子虫を検査したところ、心筋から100%の汚染率で検出され、その他の部位においても住肉胞子虫が検出された。

諸外国における生食実態の情報収集では、様々な国において畜産食品の生食がなされていることが明らかとなり、中でもドイツにおいて豚の生挽肉製品(メット)が容器に包装され、スーパーマーケット等で流通していることが分かった。しかしながら、メットに対する特別な規格基準等は存在しておらず、食中毒リスクが高いと判断される食品については行政当局による監視指導の頻度を上げる手法により管理している他、製造者による自主規制を行っていることが示された。一方で、諸外国では、生肉を原因食品とするサルモネラ、腸管出血性大腸菌、エルシニア、旋毛虫等による食中毒が発生していることも明らかとなった。

放射線照射による牛レバー中の食中毒菌低減手法については、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラを用いてガンマ線による検討を行った。その中で最も放射線抵抗性が高かったサルモネラ菌株の生残曲線から求めた  $D_{10}$  値は、0 含気条件で 0.62 kGy、脱気条件で 0.63 kGy、-80 含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy であった。また、同株を  $10^5$  CFU/g を接種した牛肝臓各 5 検体について、6、7 及び 8 kGy のガンマ線照射を行ったところ、含気条件で 7 kGy、脱気条件で 8 kGy によって全検体がサルモネラ非検出となった。照射による副生成物については、脂質の放射線分解物が 0 6 kGy、-80 10 kGy までの照射で線量依存的に生成することが確認されたものの、1 kGy の照射により前駆脂肪酸 1 nmole から生成する 2 - アルキルシクロブタノン類はこれまで照射された畜肉中で報告されている値より小さいものであった。また、トランス脂肪酸も線量依存的な微増が見られたが、WHO の推奨値との比較において、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えるものではないと考えられた。脂質酸化の指標であるチオバルビツール値は 0 含気条件での増加が見られたが、脱気条件下及び -80 ではほとんど変化がなかった。フランについては照射後も検出されなかった。照射により牛肝臓臭気の変化が確認され、その原因となる可能性のある物質として、ベンジルメルカプタン、フェニルエチルアルコール、スカトールが検出された。

消毒薬による殺菌法は、胆管から消毒薬を注入したのち、肝臓各部位における大腸菌群の検出を行う方法で評価した。その結果、塩素系消毒薬では大腸菌群陰性となる割合が高いものが見られた。非塩素系消毒薬では、殺菌効果はほとんど認められなかった。また、急速冷凍とチルド融解を組み合わせる手法についても検討した。その結果、凍結融解を行ったもので大腸菌群陽性率が低くなる結果が認められたものの、その後の増菌培養で腸内細菌科菌群が高率に検出された。

高圧処理による殺菌では、500MPa10 分の処理で大腸菌 ATCC25922 株を 5log 減少させることが可能であった。一方で、圧力条件に比例して、肝臓の白化、硬化が見られたため、250MPa、60-180 分の処理を行ったところ、肝臓の変色、硬化は少なかったものの、菌数低減は 2log にとどまった。また、近年高圧殺菌を行うための機器の開発も進んでいることから、牛肝臓以外に鶏ササミを用いて 300MPa 5 分を 6 回反復させる実験を行ったところ、カンピロバクターについては定性試験で菌が検出され、完全な殺菌には至らなかったものの、定量試験では 7log 以上の菌数低減が可能であった。サルモネラについては結果のばらつきが見られ、3-5log の菌数低減であった。一方で、ササミの変色、硬化が認められた。

以上の結果から、畜産食品の生食には、牛肝臓の腸管出血性大腸菌症、シカ肉及び牛肉の住肉胞子虫、豚肉のサルモネラ症及びエルシニア症等の健康被害リスクがあることが示された。本研究で検討した非加熱殺菌法において、実験開始当初には汚染菌を 5log 削減させることを目標と設定していたが、国内の 1 か所の食肉処理場からの肝臓検体で、 $10^6$ CFU/g 以上の大腸菌群汚染が見られた。また、大腸菌群汚染率、汚染菌数共に夏場

に高く、冬場に低い傾向を示すことが明らかとなった。今回検討した非加熱殺菌法のうち、現時点で牛肝臓内の食中毒原因菌に対して一定の低減効果が得られたものは、放射線照射及び高圧処理であった。但し、放射線照射は、牛肝臓に臭気が発生するという問題点もあった。また、高圧処理については、臭気の変化はなかったものの、色調及び硬度の変化が見られる問題点が残された。いずれの殺菌方法でも、これまでに検討した条件では、本研究で明らかになった中で最も高いレベルの大腸菌群の汚染があった検体（ $10^6$  CFU/g 以上）について、完全に汚染菌を死滅させるには十分ではない可能性が示唆された。

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  
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  
三木 太平 岩手県食肉衛生検査所  
阿部 申 日本大学  
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、牛肝臓及び豚肉と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。しかし、流通は限定的であるものの、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、鶏肉の生食によるカンピロバクター等による食中毒事例も数多く報告されている。一方、一部の国民からは、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微生物を低減し、可能であれば安全に提供することを目的として、消毒薬、放射線

照射及び高圧処理の効果と問題点について科学的に検証した。

## B. 研究方法

### (1) 諸外国における食肉の生食実態調査

平成 25 年度は、海外においてどのような種類の食肉が生食されているか、また、それらによる健康被害の発生状況について、株式会社三菱総合研究所への委託調査を実施した。調査は、インターネットを通じて生食料理実態及びそれらによる健康被害実態について行うと共に、PubMed 等による文献調査、更に各国大使館への電話及び書面送付を通じて実施した。平成 26 年度には、同研究所への委託調査として、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) 牛消化管、肝臓、唾液及び胆汁中の大腸菌群の菌数

牛肝臓から無菌的に約 50 g の組織を切り出しストマック袋に入れ、等量の滅菌 PBS を加えストマック処理を行った。その他消化管組織と内容物は、それぞれ 10 g を取りだし、組織は等量の滅菌 PBS を加えストマック処理を、内容物は 90 ml の滅菌 PBS に懸濁した。唾液は 5 mL、胆汁は 10 mL 採取した。それぞれ処理後の液、唾液と胆汁を滅菌 PBS で 10 倍段階希釈し、SMAC 寒天培地に植菌し

STEC の有無及び大腸菌群の菌数を調べた。

### (3) 牛肝臓から分離した細菌の菌種同定

牛肝臓内から分離した細菌からボイル法で鋳型 DNA を調製し、16S rRNA 遺伝子、約 500 bp を増幅できるプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を精製後、塩基配列を解析し菌種を同定した。

### (4) 組織化学的解析による牛肝臓内の細菌汚染部位の同定

牛肝臓約 10 g を切り出し、直ちに中性の 10% のホルマリン溶液に浸漬した。プロセッサを用いて組織を固定化し、パラフィンで包埋後、ミクロトームカッターで厚さ約 3  $\mu$ m の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色後、顕微鏡にて細菌汚染を確認した。

### (5) 牛消化管、肝臓内、胆汁における *stx* 遺伝子の検出

屠畜解体直後に採取した舌、第一胃内容物、十二指腸、十二指腸内容物、盲腸、盲腸内容物、肛門、肛門内容物をそれぞれ約 10 g、肝臓 (部位 1-5) を 50 g (又は 100 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。肝臓表面は滅菌スワブで約 400  $\text{cm}^2$  を拭き取り、スワブを 5 mL の PBS に懸濁し、ストマッカー処理検体を含めそれぞれから 1 mL を取り、1.25 倍の TSB 4 mL に加え、37°C、18 時間、浸透培養

した。2015年10月以降は、50gの肝臓にTSB 50 mLを加えストマック処理し、その後、TBS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。唾液と胆汁についてもそれぞれ1 mLを同様に培養した。増菌後、牛肝臓以外は培養液100 µLを900 µLの滅菌TE buffer (pH 8.0)に加え、100°C、10分間の加熱処理後、遠心分離を行い得られた上清をPCR用の鋳型DNAとした。牛肝臓検体は、増菌培養後1 mLを遠心分離し、ペレットを回収した。ペレットに1 mLのTEを加え100°C、10分間加熱処理し、遠心上清を鋳型DNAとしてPCRに供した。

*stx* 遺伝子検出用のPCR法はPalらの方法に準じて行った (Indian J. Med. Res., 110: 83-85, 1999)。得られたPCR産物は3%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV照射下で特異的な遺伝子の増幅を確認した。

#### (6) 種々の塩素系消毒薬の殺菌効果の比較

##### 6-1: 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、各種塩素系・非塩素系消毒薬を、胆管を通じて肝臓内に注入し、洗浄、殺菌した。尚、消毒薬Aは電解水、B、C、Dは非塩素系消毒薬、Eは塩素系消毒薬を用いた。その後、平成25-27年度分担研究報告書「牛肝臓内の大腸菌の分布とその殺菌法の検討」図6に示したように肝臓を5つの部位、すなわち、部位1-5からそれぞれ約50g(2014年10月より2015年3月まで)あるいは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で希釈後100 µLをMacConkey寒天培地に植菌し、大腸菌群の菌数を測定した。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。ストマッカー処理した液を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で一晩培養した。

##### 6-2: 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で凍結後、チルド条件で融解し、上記と同様に処置した。

#### (7) 畜産食品を原因とする寄生虫性食中毒の発生実態調査

厚生労働省監視安全課食中毒被害情報管理室より、2003年から2012年までの、「その他」が原因物質の食中毒情報を、各事例について提供を受けた。

2003年から2012年の間に発生した食中毒について、事例数および患者数について解析した。食中毒統計において、総数、細菌、ウイルス、化学物質、その他、

不明の項目について、年次推移を解析した。「その他」の占める割合について検討した。

「その他」について、原因物質項目 2009 年から 2010 年にかけて、ヒラメおよび馬肉食中毒の原因が明らかになり、情報が周知され始めた。厚生労働省に届け出される記述には形式が指定されておらず、同一性がない。解析のため、適切な「整理項目名」を定め、記述のものと解析用の項目名を対比して示した。

#### ( 8 ) 馬肉と *S. fayeri* 遺伝子検査法

厚生労働省が通知した検査法に従い、馬肉各検体から 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  $\mu$ L を取り、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen) を用いて DNA を抽出した。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。定性 PCR の PCR 条件は 94 、3 分を 1 ステップ、94 、30 秒、53 、30 秒、1 分を 30 サイクル、72 、5 分を 1 ステップとした。用いた試薬は 10 $\times$ Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa) である。

同じそれぞれの検体から、馬肉を 10 g、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。均質化後、粥状になった馬肉サンプルを 200  $\mu$ L 採取し、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen) 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製した。また、定量 PCR の PCR 条件は 95 、10 分を 1 ステップ、95 、30 秒、60 、1 分を 45 サイクルとした。用いた試薬は GeneAce SYBR qPCR Mix (NIPPON GENE) である。StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

#### ( 9 ) エゾシカ肉の住肉孢子虫遺伝子検査

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孢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、遺伝子陽性が否か判断した。

#### ( 10 ) 牛肉における住肉孢子虫検査

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 ヲ月齢、すべてメスであった。各牛からそれぞれ筋肉 8 ~ 9 ヲ所、計 52 ヲ所を採材した。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。

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。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をシストとして確認し計数した。



厚生労働省が通知した、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法を牛肉に応用した。住肉胞子虫の 18S rRNA 遺伝子を標的とした定性 PCR を実施した。

( 1 1 ) 放射線照射による牛肝臓からの微生物除去及び副生成物の検討

11-1 : 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 で凍結保存した。

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 50 g 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、氷冷(0 )照射では照射氷中に 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。

11-2 : 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 *Escherichia coli* O157 DT66 株 ( stx-1, 2 陰性 )、*Salmonella* Enteritidis (IFO3313、他牛糞便由来株 4 株) および *S. Typhimurium*(IFO12529、他牛糞便由来株 2 株)、*Campylobacter jejuni* 5096 株を用いた。

*E. coli* および *Salmonella* は、Trypticase Soy Broth (Difco)を用いて、37 一昼夜振とう培養した後、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。*C. jejuni* 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。それぞれの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 $10^9 \sim 10^{10}$  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。

11-3 : 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 )および凍結(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。

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。

11-4 : 牛肝臓の殺菌試験

菌体の接種は、自然解凍した 25 g 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、氷水中あるいは、-80 の凍結庫内で 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。

照射後の検体は、解凍後直ちに菌数計測した。

#### 11-5：生菌数測定および標的微生物の検出

ガンマ線照射後の牛肝臓は、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。

*E. coli* および *Salmonella* の計数は、各 10 倍段階希釈試料液を、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、これを 35 で 24 時間培養し、その出現集落数から 1g 当たりの一般生菌ならびに腸内細菌科の菌数を求めた。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、標的菌種であることを PCR 法もしくはイムノクロマト法にて確認した。

*C. jejuni* の計数は、10 倍段階希釈試料液を mCCDA 平板（Oxoid）にスパイラルプレーティング法で塗抹した。mCCDA 平板は 41.5 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。

別途、*Salmonella* の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、37 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 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。

#### 11-6：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。

#### 11-7：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、クロロホルム/メタノールにより総脂質を抽出した。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、ガスクロマトグラフにより分析した。（詳細条件は、平成 26 年度分担研究報告書参照）

#### 11-8：2-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、クロロホルム/メタノール（2:1）（C/M）溶液で、脂質を抽出し、これを、アセトニトリルに再溶解させた後、1g のシリカゲルカラム（Merck Silica gel 60 70-230 mesh）2本に添加し、精製したものを GC-MS の分析試料とした。内部標準としてシクロヘキシルシクロヘキサノンを用い、規定濃度の 2-ドデシルシクロブタン（2-dDCB）および 2-テトラデシルシクロブタン（2-tDCB）、2-テトラデセニルシクロブタン（2-tDeCB）にマトリックスを添加した標準溶液で作成した検量線を用いて定量した。（試料調製の手順と GC-MS による分析条件の詳細は、本研究の平成 27 年度分担研究報告書参照）

#### 11-9：フランの分析

フランの分析は、Yoshida 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。ガスバリア性のポリエチレンバック（PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 90 × 120mm）含気状態で包装した牛肝臓（50g 程度）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（約 4℃）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。（分析条件の詳細については、平成 26 年分担研究報告書を参照）

#### 11-10：臭気成分の分析

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）に入れ、含気状態のままヒートシールし、予冷の後、3 kGy（0℃）、または 6kGy（-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。

異臭分析は、大和製罐（株）総合研究所に依頼して実施した。解凍直後の試料（40g）を細かく刻み、純水（300mL）とともに減圧蒸留（55℃ 90hPa）し、留分をジエチルエーテルで抽出して濃縮後、臭い嗅ぎ GC 及び GC-MS で分析した。（詳細条件は H25 年度分担研究報告書参照）

（12）高圧処理による牛肝臓及び鶏ササミ中の食中毒菌の不活化に関する検討及び高圧処理による肉質の変化に関する研究

平成 25 年度は、牛肝臓に *E. coli* ATCC25922 株を人工的に接種し、HPV-80C20-S（スギノマシン社製）を用いて、200、300、400、500MPa で 10 分間毎の高圧処理を行った。処理後、PCA 培地による生残菌数の計測と *E. coli* の選択培地である XMG 培地を用いて発育した青色の集落を計測した。処理を行った肝臓については色調計で色調の変化を測定すると共に、硬度の確認を行った。更に、ホルマリン固定及びパラフィン包埋後、病理切片を作成し、HE 染色により光学顕微鏡による肝臓の構造変化について解析した。高圧処理による微細形態変化

の観察は、高圧処理後の検体を 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。

平成 26 年度は、250MPa の高圧処理及び 60 分間毎の圧力時間が *Escherichia coli* と *Salmonella* Typhimurium に及ぼす死滅効果を、*E. coli* ATCC 25922 と *S. Typhimurium* IID 1000 を用いて調べた。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。高圧処理装置は平成 25 年度と同じものを用いた。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*  $10^8$  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 $\mu$ 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、ストマッカー袋に肝臓 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/mm<sup>2</sup>) で測定した。

平成 27 年度は、高圧処理による鶏ササミ中の食中毒原因菌の不活化の検討を行い、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ック処理して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。同時に高圧処理した検体を10%緩衝ホルマリン液で37℃一夜固定したのち、薄切して再度10%緩衝ホルマリン液にて固定した。パラフィン包埋後、切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。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. 研究結果

### (1) 諸外国における食肉の生食実態調査

平成25年度のインターネット等による調査の結果、牛肉の生食料理はタイ、韓国、トルコ、フランス、イタリア、チェコ、エチオピアに存在していることが明らかとなった。豚肉の生食料理はドイツ、羊の生食料理はレバノン、馬はフランスで生食されていた。それらによる健康被害は、ドイツ(豚)、オランダ(牛)、トルコ(牛)等で報告されていた。これらのほとんどは、レストラン及び家庭での調理・喫食によるものであったが、ドイツにおける豚の生食料理メットは、容器に包装され、スーパーマーケット等で市販されていた。食肉の生食による健康被害はフランス及びドイツで報告されており、原因物質は病原性大腸菌、サルモネラ、旋毛虫等であった。

平成 26 年の調査では、前年度調査により豚肉の生食製品（メット）がスーパーマーケット等で市販されていることが明らかとなったドイツにおいて、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）牛消化管、肝臓、唾液及び胆汁中の大腸菌群の菌数

牛消化管内、肝臓、唾液及び胆汁の大腸菌群の菌数について 2012 年 11 月から 2014 年 8 月まで調べた結果を平成 25-27 年度分担報告書図 1 に示した。唾液、第一胃、十二指腸、盲腸、肛門内容物の菌数はそれぞれ  $10 \sim 10^{10}$  CFU/g であった。一方、肝臓内を 5 つの部位に分けて調べた結果、部位 1 と 2 では、それぞれ 22%、33% で陽性となり、菌数も  $10 \sim 10^6$  CFU/g であった。部位 3-5 では 60% 前後の陽性率で、菌数は  $10 \sim 10^4$  CFU/g であった。胆汁の陽性率は 11% であったが、菌数は  $10^5 \sim 10^8$  CFU/ml と高かった。胆汁中の菌数が多い検体は、肝臓内の菌数も多かった。しかしながら、胆汁からの細菌が検出限界以下 ( $10 > \text{CFU/mL}$ ) の検体でも、肝臓内から細菌が検出される場合もあった。

牛肝臓の各部位における夏場の大腸菌群陽性率は冬場よりも高かった（平成 25-27 年分担報告書図 2、3）。例えば部位 3-5 は、冬場は 40-50% であったが、夏場の陽性率は 80% 前後であった。一方、部位 1 と 2 では、夏場の陽性率はそれぞれ 32%、46% であったが、冬場はそれぞれ 13%、25% であった。肝臓内で検出された大腸菌群の菌数は季節に関係なく胆汁で高濃度の菌が検出された場合を除けば、部位 1 と 2 では  $10^2$  CFU/g 以下、部位 3-5 では  $10^3$  CFU/g 以下であった。Sawdust Liver（鋸屑肝）についても同様に調べた結果、部位 1 と 2 の大腸菌群の陽性率は 50% と 60%、部位 3-5 の陽性

率は 80-85%と共に高かった。菌数も  $3.3 \sim 10^7$  CFU/g が検出され、Sawdust Liver では大腸菌群の陽性率のみならず菌数も多かった（平成 25-27 年分担報告書 図 4）。

#### （3）牛肝臓から分離した細菌の菌種同定

牛肝臓内から分離した菌の 16S rRNA 遺伝子約 500 bp の塩基配列を解析した結果、*Escherichia* sp, *Klebsiella* sp, *Serratia* sp, *Citrobacter* sp 等腸内細菌科に属する細菌として同定された。

#### （4）組織化学的解析による牛肝臓内の細菌汚染部位の同定

69 検体の肝臓の細菌汚染部位を組織化学的に調べた結果、13 検体で胆管内又は門脈/類洞内に細菌が検出された。胆管内に検出された 1 例を平成 25-27 年報告書図 5-1 に、類洞内に検出された 1 例を同図 5-2 に示した。類洞内に細菌が検出された場合、図 6 に示した部位 3-5 の加熱用として提供されていた部位がほとんどであるが、まれに 1 と 2 の生食用として提供されていた部位からも検出された。しかしながら細菌が検出された周辺部位にマクロファージの集積や炎症が認められなかったことから屠畜解体後に何らかの理由で肝臓内が汚染された可能性も考えられる。

#### （5）牛消化管、肝臓内、胆汁における *stx* 遺伝子の検出

牛消化管、肝臓から *stx* 遺伝子を PCR 法で検出した結果を平成 25-27 年度分担

報告書表 1 にまとめた。胆汁では調べた 232 検体全てで検出されなかった。肝臓の内部（253 検体）と表面（181 検体）からは、それぞれ 1.2%、8.8%の割合で検出された。舌の陽性率は 6.5%、唾液は 22%、第一胃内容物は 8.7%、十二指腸は内容物で 15%、組織で 5.9%、盲腸は内容物・組織とも 26%、肛門は内容物で 45%、組織で 83%と第一胃から肛門に近づくに従い陽性率は上昇し、肛門においては内容物よりも組織での陽性率の方が高かった（平成 25-27 年度分担報告書表 1）。

一方、肝臓の部位別で見ると、0.5 g/1.0 g 相当の増菌培養液から肝臓内部の部位 1（201 検体）と 2（205 検体）、すなわち生食用として提供されていた部位からは *stx* 遺伝子は検出されなかったが、加熱用として提供されていた部位 3（200 検体）、4（191 検体）、5（191 検体）からはそれぞれ 1、3、1 検体から *stx2* 遺伝子が検出された。肝臓表面では 133 検体中 9 検体から *stx2* 遺伝子が、1 検体から *stx1/2* 遺伝子が検出された。Sawdust Liver では肝臓内部と胆汁それぞれ 20 検体について調べた結果、部位 3 と 5 のそれぞれ 1 検体で *stx2* 遺伝子が検出された（平成 25-27 年度分担報告書表 2）。さらに、50 g 相当の肝臓を増菌培養した検体では、調べた 48 検体全てで左葉（生食用として提供されていた部位 1 と 2）、右葉（加熱用として提供されていた部位 3-5）、胆汁では調べた 36 検体全てで *stx* 遺伝子は検出されなかった（表 3）。一方、肝臓表面からは 6 検体で *stx2* 遺伝子が検出された。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。

#### (6) 種々の塩素系消毒薬の殺菌効果の比較

6-1: 肝臓を5つの部位に分けた場合の大腸菌群細菌数と塩素系消毒薬の殺菌効果

5種類の消毒薬(2種類の塩素系 [消毒薬AとE] と3種類の非塩素系 [消毒薬B、C、D])の殺菌効果を調べた結果を平成25-27年度分担報告書表4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での大腸菌群陽性率は26%と23%、消毒薬Eの場合、それぞれ0%で、消毒薬B-Dの56%-86%と比べて低かった。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、消毒薬と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平成25-27年度分担報告書表5に示した。凍結融解後2次増菌した場合、生食用として提供されていた部位1と2とで冬場では40-48%、夏場では60%で腸内細菌科菌群が検出された。言い換えれば、それぞれ50-60%、40%では腸内細菌科菌群が全く検出されなかった。一方、消毒薬B、C、Dでは凍結融解後の腸内細菌科菌群の陽性率が90-100%であった。

6-2: 肝臓を左葉、右葉で分けた場合

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左葉(部位1と2)

と加熱用として提供されていた右葉(部位3-5)に分け、2.5gを10カ所から採取した結果を平成25-27年度分担報告書表6にまとめた。最も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、すなわち、2,000ppmと500ppmで評価した。その結果、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。凍結することで左葉の陽性率は33%まで下がったが、2次増菌を行うと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(平成25-27年度分担報告書表6)しかしながら、消毒薬Eを用いた場合、凍結無しで左葉の陽性率は8%であったのに対し右葉では33%であった。左葉では凍結後、2次増菌を行うことで陽性率は50%となった。

#### (7) 畜産食品を原因とする寄生虫性食中毒の発生実態調査

寄生虫性食中毒が包有される「その他」に分類される食中毒は、2007年までは年間で一桁の発生件数を示したにすぎない。2008および2009年は17件と、いずれも少ない発生数になっている。2010年に28件となり、増加傾向を示し、2011年は68、2011年に至っては100件を越える事件数を示した。ヒラメ及び馬肉食中毒の原因が明らかになったこともあり、2010から2011年を境に、急激な「その他」の食中毒が増加していることが読み取れる(平成25年度分担報告書表2)。

10年間で266件の発生がみられているが、そのうち、寄生虫が原因となってい



るのは258件あり、97%を占めた。細菌性、毒素性、混合した原因によって「その他」に分類された食中毒はわずかに3%に過ぎなかった。

2003年から2010年までは、3事例を除き、すべてが、アニサキス属が原因となっていた。2011年になると、アニサキス属を越えるクドアの報告、また、サルコシスティスが原因になっている事例の発生がみられている。2012年は、アニサキスは倍増し、また、クドアも発生件数が増加した(平成25年度分担報告書 表3)。

#### (8) 馬肉と *S. fayeri* 遺伝子検査法

*S. fayeri* の18S rRNA 遺伝子を標的とする定量PCRを行った。馬肉0.3gを用いる方法と10gを均質化して検査に供する方法の比較を行った(平成26年度分担報告書 表4)。遺伝子陰性と判定された1番の検体で、馬肉0.3g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10g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10gを均質化する方法で、0.3g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10g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0.3g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10gを均質化する方法では、馬肉0.3gを用いる方法よりも、低いrSDを示した。

#### (9) エゾシカ肉における住肉孢子虫遺伝子検査

エゾシカ肉よりDNAを抽出し、住肉孢子虫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、住肉孢子虫18S rRNA 遺伝子の増幅が確認された。

#### (10) 牛肉中の住肉孢子虫検査

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孢子虫のシストと判定された(平成27年度分担報告書 図3)。シストの形態は *S. cruzi* を推定させた。6頭の牛の9部位における、住肉孢子虫のシストを計数した(平成27年度分担報告書 図3)。6頭の牛のいずれかの部位に、住肉孢子虫シストを確認した。シストが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。

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、住肉孢子虫遺伝子検出操作を実施した。馬肉について検討された現行法を応用したところ、約1,100

bp の DNA の増幅が確認された。DNA サイズが同様に、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た住肉胞子虫の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。

牛肉中の住肉胞子虫について、顕微鏡による検査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、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果が大きくかい離していた。

#### ( 1 1 ) 放射線照射による微生物除去

11-1：各種細菌に対するガンマ線の殺菌効果

11-1-1： *E. coli* O157

牛肝臓および牛挽肉中に、*E. coli* O157 DT66 株を接種し、段階的に線量を変えて照射し、生残曲線を得た。牛肝臓及び挽肉中の DT66 株は、氷冷条件 (0 ) 0~3 kGy、凍結条件 (-80 ) 0~5 kGy の範囲で、線量に対して指数関数的に減少し、生残菌数の線量に対するプロットは、ほぼ直線となった。このプロットの傾きから、 $D_{10}$  値を求めた結果は、平成 25 年度報告書分担研究報告書 表 1 に示した。牛肝臓内部に接種した腸管出血性大腸菌 O157:H7 DT-66 株の  $D_{10}$  値は、氷冷(0 ) 含気条件で 0.36 kGy、脱気条件で 0.38 kGy、凍結(-80 )含気条件で 0.80 kGy、脱気条件で 0.96 kGy であった。氷冷・凍結もしくは含気・脱気包装いずれの試験

区においても、牛肝臓におけるガンマ線殺菌では牛挽肉と比較して高い線量が必要とする結果となった。特に凍結下では挽肉と比較して  $D_{10}$  値が高く算出された。また、氷冷区と凍結区を比較した場合、凍結区の  $D_{10}$  値の方が高く観測された。さらに含気包装区と真空包装区においても比較したところ、殺菌のためには真空包装区の方が含気包装区と比較して高い線量が必要であった。

11-1-2： *Salmonella*

サルモネラ供試菌 8 株に対し、リン酸緩衝液中におけるガンマ線の感受性について比較したところ、1 kGy 照射後の生残率は *S. Enteritidis* IFO3313 株が供試菌株の中で最も高かった(平成 25 年 分担研究報告書図 1)。そこで、この株を被検菌として選択し、以降の実験に用いた。

*S. Enteritidis* IFO3313 株を被検菌として、牛肝臓および牛挽肉中に接種し、ガンマ線照射を行った際の生残曲線は、低線量域で肩が見られるシグモイド型となったが、(平成 25 年度分担研究報告書 図 2)、便宜的に指数関数型であるとして  $D_{10}$  値を、直線回帰より求めた。(平成 25 年度分担研究報告書 表 2 および平成 27 年度分担研究報告書 表 1)。研究期間を通じての結果を統合すると *S. Enteritidis* IFO3313 株を、牛肝臓中での  $D_{10}$  値は、氷冷(0 )含気条件で 0.62 kGy、脱気条件で 0.63 kGy、凍結(-80 )含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy と求められた。これらの値は、前項で示した腸管出血性大腸菌 O157 の値よりも高く、サルモネラの殺菌にはより大きな線量が必要であった。また、腸管出

血性大腸菌 O157 と同様、牛肝臓におけるガンマ線殺菌では牛挽肉と比較して高い線量を必要とする結果となった。照射温度、包装条件による放射線感受性の違いについても、腸管出血性大腸菌 O157 と同様、凍結下、脱気条件の方が、放射線抵抗性が強く ( $D_{10}$  が大きく) になった。

#### 11-1-3 : *Campylobacter*

牛肝臓および牛挽肉中において *C. jejuni* 5096 株を接種し、ガンマ線照射を行った際の  $D_{10}$  値を求めた(平成 26 年度分担研究報告書 表 1)。 *C. jejuni* の牛肝臓中の  $D_{10}$  値は、氷冷 (0 ) 含気条件で 0.26 kGy、脱気条件で 0.33 kGy、凍結 (-80 ) 含気条件で 0.58 kGy、脱気条件で 0.69 kGy であり、大腸菌株よりも低い結果を得た。また、牛肝臓における  $D_{10}$  値はいずれの条件においても、牛挽肉中での値よりも大きかった。なお、-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。

#### 11-1-4 : ガンマ線による *Salmonella* 死滅効果

前項までで最も放射線抵抗性が強いと考えられた *S. Enteritidis* IFO3313 株を約  $10^5$  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 となるようガンマ線照射した場合の不活性化について検討を行った。各条件における、5 検体中の検出 (陽性) 数は、平成 27 年分担研究報告書 表 2 に記載した。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。なお、本

試験にて接種した菌数は  $3.0 \times 10^5$  CFU/g と求められた。

#### 11-2 : 牛肝臓のガンマ線照射による副生成物

##### 11-2-1 : TBA 価

牛肝臓を含気あるいは脱気条件で包装し、氷冷 (0 ) で 3、6 kGy、凍結状態 (-80 ) で 5、10 kGy のガンマ線照射を行い、脂質の過酸化と相関があるとされる TBA 価を測定した。含気包装では、氷冷 (0 ) 照射において TBA 価の線量に応じた有意な増加が認められた。含気包装、凍結状態 (-80 ) の照射においても統計的に有意な TBA 価の増加がみられたが、その変化量は非常に小さかった。また、脱気包装では、氷冷、凍結照射ともに、最高線量の照射でも有意な TBA 価の増加は認められなかった。(H26 年度分担研究報告書 表 3)

##### 11-2-2 : 脂肪酸組成、トランス脂肪酸含量

前項と同様の照射条件において、主な脂質構成脂肪酸の含量を測定した。供試した牛肝臓には、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 などの炭素数 18 (C18) のトランス異性体の他、C14~C17 のモノエンのトランス異性体も非照射及び照射のいずれの検体にも含まれていた。照射による不飽和脂肪酸の有意な減少は、い

ずれの検体においても認められなかった (H26 年分担研究報告書 表 3)。

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、6 kGy の照射では 18:1 および 18:2 のトランス異性体の総量や C18 のトランス異性体の総量、より短鎖のトランス異性体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。脱気包装、0、6 kGy 照射における、C18 総トランス脂肪酸の含量は、 $1.40 \pm 0.03$  g/100 g 脂質 (非照射コントロールは  $1.04 \pm 0.08$  g/100 g 脂質)、その他の脂肪酸も合わせた総トランス脂肪酸量は、 $2.51 \pm 0.10$  g/100 g 脂質 (非照射コントロールは  $2.18 \pm 0.12$  g/100 g 脂質) となった。また、凍結下の照射でも氷冷下に比べ変化量は小さいものの照射によるトランス異性体の増加の傾向が認められた。脱気包装 10kGy での増加量は統計的に有意で、C18 総トランス脂肪酸の含量は、 $1.26 \pm 0.05$  g/100 g 脂質、その他の脂肪酸も合わせた総トランス脂肪酸量は、 $2.42 \pm 0.10$  g/100 g 脂質であった。なお、本研究で使用した牛肝臓の脂質含量は、5.03 g/100 g 肝臓生重量 であった。含気包装と脱気包装の同一温度、同一線量での間のトランス異性体含量を較しても、統計的な有意差は認められず、TBA 価の場合と異なり、包装条件の違いによる影響はほとんど認められなかった。(H26 年分担研究報告書 表 2)

#### 11-2-3: 2-アルキルシクロブタン類

肝臓成分の寄与による分解反応を考慮して、抽出溶媒をクロロホルム/メタノールとし、定量時にマトリックス検量線を用いる方法により、照射した牛肝臓 (凍結(-80 )照射、5、10 kGy、氷冷(0 )照射 3、6kGy)において、3種の2-ACBs (2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB)の定量を実施した。添加回収試験による回収率は73~116%で、繰り返し標準偏差は6%未満であった。

非照射の肝臓には、いずれの2-ACBsも検出されず、照射した肝臓では、パルミチン酸由来の2-dDCB、ステアリン酸由来の2-tDCB、オレイン酸由来の2-tDeCBが線量に依存して生成し、たとえば含気包装、凍結状態(-80 )10 kGyにおける、含量は、 $10.3 \pm 0.30$ 、 $30.7 \pm 0.5$ 、 $55.5 \pm 1.6$  ng/g 生重量であった。他の条件の照射においても、照射肝臓中の3種の2-ACBsの含量は、元の脂質の脂肪酸組成を反映し、2-tDeCB、2-tDCB、2-dDCBの順に高い含量の2-ACBsが検出された。(詳細生成量についてはH27分担研究報告書 表4参照)肝臓生重量1g・1 kGyあたりの生成量は、2-tDCBが2-dDCB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。前駆脂肪酸1 mmoleあたり1 kGyの照射で生成する2-ACBsの分子数は、0.3~0.9 nmole程度であった。(H27分担研究報告書 表5参照)

#### 11-2-4： 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 0.5ng/g であった。牛肝臓を分析した結果、照射（6 kGy、10 kGy）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。

#### 11-3： ガンマ線照射による臭気成分

牛肝臓試料から減圧蒸留により抽出した臭気成分をにおい嗅ぎ GC（GC-O）で分析した結果と GC-MS による分析の結果を統合し、照射試料（含気包装 0、3 kGy、および 80、6 kGy）において、照射により増加する臭気成分としてベンジルメルカプタンが示唆された。なお、GC-MS 分析において、これらの化合物の該当ピークは非照射のコントロール試料においても検出された。（H25 分担研究報告書 図 3、4）

#### （12）高圧処理による牛肝臓及び鶏ササミ中の食中毒菌の不活化に関する検討及び高圧処理による肉質の変化に関する研究

平成 25 年度の検討では、リン酸緩衝液に懸濁した *E. coli* の高圧処理前の未処理での菌数は対数値で 9 log CFU/ml であり、200MPa、10 分処理では未処理とほぼ同様の菌数となり、高圧処理による菌数の減少は認められなかった。処理時間を延長した 20 分処理で菌数が減少し始め、30 分処理で 1 log の減少が認められた。

300MPa では、200MPa に比べて急激な菌数の減少が観察され、10 分処理で 4.4 log CFU/ml、20 分処理で 3.3 log CFU/ml、30 分処理で 2.9 log CFU/ml に減少した。400MPa では 10 分処理で 3.0 log CFU/ml、20 分処理で 2.6 log CFU/ml、30 分処理で 2.9 log CFU/ml に減少した。最も圧力の高い 500MPa では、10 分処理で 1.9 log CFU/ml、20 分処理と 30 分処理では検出限界以下であった。

以上の結果、高圧処理により 5 log CFU/ml の有効な殺菌効果が認められた圧力は 400MPa と 500MPa であった。さらに高圧処理時間を延長するにつれて、緩やかではあるものの殺菌効果が高まる傾向が認められた。

高圧処理による肝臓中の *E. coli* の不活化効果とその外観に及ぼす影響の検討では、牛肝臓に接種した *E. coli* の高圧処理による不活化効果を非選択培地の PCA 培地を用いて生残菌数を測定した。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、牛の肝臓に *E. coli* を接種して高圧処理条件を 200MPa、300MPa、400MPa、500MPa そして処理時間 10 分で行った。その結果、肝臓中の未処理菌数は 7.1 log CFU/g を示した。200MPa 処理ではほとんど菌数の減少が観察されなかった。300MPa から菌数の減少が観察され 1.5 log CFU/g の減少が認められた。さらに 400MPa では 3.0 log CFU/g の減少、最も高い圧力の 500MPa では 5 log CFU/g の菌数減少が認められた。実際に有効な 5D 程度の殺菌効果が認められた圧力は 500MPa のみであった。

次に、同様に処理した試料を大腸菌の選択培地である XMG 培地を用いて検出測定した結果、検出培地である非選択培地の PCA 培地を用いた場合と顕著な差は観察されなかった。

高圧処理による肝臓色の变化を測定した。肝臓の外観は圧力が高まるにつれて肝臓の色彩は、赤みが減少し肌色に変化する傾向が認められた。色彩色差計では、未処理の肝臓数値は L 値が  $36.7 \pm 1.3$ 、a 値が  $6.5 \pm 0.6$ 、b 値が  $2.2 \pm 0.3$  を示した。圧力が高まるにつれて、L 値は 200MPa より数値が増加し、300MPa で  $44.3 \pm 1.1$ 、500MPa で  $50.4 \pm 0.4$  に増加した。a 値では 300MPa に  $10.1 \pm 1.0$  に数値の増加が認められたものの 400MPa と 500MPa では顕著な変化は認められなかった。さらに b 値では 300MPa まで大きな数値の変動は見られなかったものの、500MPa では  $8.0 \pm 0.6$  にまで増加した。高圧処理における肝臓の色と硬さの変化を観察したところ、肉色は処理前では鮮明な赤褐色を示したものの、200MPa では赤みが少なくなるものの肝臓色を維持していたが、300MPa 以降、400MPa と 500MPa と圧力が高まるにつれて、赤みが退色し、白っぽくなり加熱したような色合いとなった。

硬さについては、300MPa 以上で、当初の肝臓の柔らかさではなく、明らかに硬さが認められ、400MPa と 500MPa では弾力も感じられるようになった。特に未処理の肝臓とは肉質がかなり異なっていた。

以上の結果から、*E.coli* に対する効果は 500MPa・10min 処理で、5D の殺菌効

果が得られ、有効な不活化効果が認められた。しかし、肝臓の状態は生の状態の色彩とテクスチャ - は失われ、別物の感触となった。

高圧処理による牛肝臓の形態学的变化を検討したところ、牛肝臓検体の体積は外見的にはほとんど変化がなかった。肝臓の色は高い圧で処理した検体ほど、暗赤褐色から淡褐色へと退色が顕著であった。牛肝臓の断面を作る際にナイフで切った際の感触では、より高圧で処理した検体ほど弾力が強く、硬くなっている傾向が認められた。また、0MPa では暗赤褐色で一様な断面を示しているが、200MPa ではやや色合いが薄くなり、300、400、500MPa では断面が淡赤褐色～淡褐色の斑状を呈していた。

光学顕微鏡による観察では、形態学的には高圧処理をした肝臓においても、肝細胞の索状配列や小葉構造などに形態的な変化はほとんど認められなかった。しかし、強拡大像では、肝細胞の細胞質内に好酸性の小顆粒が認められるようになる一方、肝細胞細胞質の染色性は全体的に低下しており、また、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。

また、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。

平成 26 年度の検討では、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  $41.74 \pm 0.48$ 、a 値が  $16.17 \pm 0.51$ 、b 値が  $7.04 \pm 0.79$  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  $43.33 \pm 1.17$ 、a 値が  $15.71 \pm 0.93$ 、b 値が  $7.18 \pm 1.26$  となった。さらに 180 分処理では L 値が  $45.68 \pm 0.95$ 、a 値が  $14.29 \pm 0.38$ 、b 値が  $7.21 \pm 0.62$  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  $0.0152 \pm 0.0068 \text{ kgf/mm}^2$  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  $0.0249 \pm 0.0048 \text{ kgf/mm}^2$ 、180 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。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。

平成 27 年の検討では、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

の菌数低減効果について、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  $1.04 \times 10^8 \text{ CFU/g}$  及び約  $7.2 \times 10^7 \text{ CFU/g}$  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  $8.5 \times 10^2 \text{ CFU/g}$ 、2 回目が  $1.05 \times 10^6 \text{ CFU/g}$ 、3 回目が  $9 \times 10^2 \text{ CFU/g}$  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。

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 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、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7log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の変化しており、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。

#### D. 考察

諸外国における畜産食品の生食実態と、衛生管理手法：平成25年度の調査により、海外において牛肉を中心として生食料理が存在することが示されたが、その大半はレストラン又は家庭において調理、喫食されるものであった。容器包装され、一般に流通される形で販売される生食製品としては、ドイツのメットのみが挙げられた。また、その品質保持期限は2週間以上と長いものであった。また、近年においてもフランスで生牛挽肉及び生の馬肉等、ドイツで生豚挽き肉及び生ソーセージ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、それらの国で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。平成26年度には、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、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

で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。

畜産食品における寄生虫：畜産食品の寄生虫に関連する危害性の分析を行った。

食中毒統計が改正される平成 23 年までは、寄生虫性食中毒は「その他」に分類されていた。個票を検索してその他を分析したところ、97%が寄生虫を原因としていて、そのほとんどがアニサキスだった。統計の項目の改正後は、アニサキスが原因の食中毒が増加していたとともに、クドアが原因である事例も多く発生していた。アニサキス食中毒は、単に発生が増加しているとは考えにくい。寄生虫性食中毒に関心が集まり、医師、保健所および衛生検査所の担当員による、検査体制の整備と精度が向上し、アニサキス食中毒事件数の実態が把握できている可能性がある。事件数においては、寄生虫性食中毒は、ウイルス性、細菌性に次いで多く発生している食中毒となっている。

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。

コンピュータソフト上で、20、30、あるいは 40 g と、検体の重量を増やし、同様な解析を行ったところ、ばらつきは減少した。検体量の増加は、可食部を少な

くすることに直結し、また、作業上の困難さを増やすので、適正な判断が要求される。

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。実際、加熱が不十分のエゾシカ肉を喫食して、有症苦情事例が発生し、患者喫食エゾシカ肉中には住肉胞子虫が検出されていることを踏まえて、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。

現行の馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法を、牛肉に適応し、その妥当性を検討した。

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。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。

牛肉中の住肉胞子虫についての遺伝子検査法を検討した。馬肉を対象とした現行法を応用した場合、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、馬肉における住肉孢子虫遺伝子検査法が、牛肉にも適応可能なことが確認された。

牛肉中の住肉孢子虫について、薄切切片でシストを確認する方法と、適応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ず、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。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、DNAを抽出する検体の量を増加させ、定量性のある遺伝子検査法の必要性が示唆された。

平成26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、大量の検体を均質化することの有効性を示した。牛肉についても、*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。*S. cruzi*の病原性に関する知見の集積も、今後必要である。

牛肝臓等における微生物汚染実態と、牛肝臓の消毒薬による殺菌：牛の肝臓内から検出される大腸菌群の由来を調べる目的で、牛の消化管内、胆汁、牛肝臓内の大腸菌群細菌の分布について調べた。その結果、唾液から肛門に至るまで調べた全ての部位から大腸菌群は検出された。大腸菌群の菌数は、第一胃から肛門に近づくに従い増加した。一方、胆汁の

陽性率は11%で、肝臓内の陽性率は22%から63%と胆汁よりも高い陽性率を示した。このことは胆汁が必ずしも肝臓内の大腸菌群の汚染源となっていない可能性を示している。但し、高濃度の大腸菌群が胆汁で検出された場合、肝臓内でも比較的高濃度の大腸菌群が検出されたので胆汁も主要な汚染源の1つであることに間違いはない。一方、大腸菌群が検出された肝臓の切片を作製し、組織化学的に肝臓内での菌の汚染部位を調べたところ、一つは胆管、もう一つは門脈や類洞等の血管で検出された。すなわち、胆管以外にも血管が汚染源となっている可能性が示唆された。肝臓を牛個体から切り離した際、門脈の切断部位は肝臓表面に露出しており、部位3-5は損傷を受けている場合も多々あり、門脈を含め損傷を受けた部位を介して汚染する可能性は十分あると考えられる。したがって、屠畜解体後の肝臓の内部が汚染しないよう門脈部分の衛生的な取り扱いが重要である。

牛肝臓内の大腸菌群の陽性率及び菌数を季節別に解析した結果、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3-5とも夏場でそれぞれ32-46%、77-81%であるのに対し、冬場ではそれぞれ13-25%、42-50%であった。胆汁中に大腸菌群が高濃度で検出された場合を除けば、季節に関係なく肝臓内の大腸菌群の菌数は部位1と2(生食用として提供されていた)で $10^2$  CFU/g以下、部位3-5(加熱用として提供されていた)では $10^3$  CFU/g以下であった。一方 Sawdust

Liver では、部位 1 と 2 の大腸菌群の陽性率は 50-60%、部位 3-5 で 80-85% と高い値となり、さらに、汚染菌数も胆汁からの汚染の影響を受けているとはいえ 10 から 10<sup>7</sup> CFU/g と高い値を示した。牛肝臓内から分離した大腸菌群の 16S rRNA 遺伝子を解析し菌種を同定した結果、*Escherichia* 属、*Citrobacter* 属、*Klebsiella* 属、*Serratia* 属菌であった。このことは、肝臓内の細菌汚染は腸管内あるいは胆汁を介している可能性が強く示唆された。

最も重要な点は、牛肝臓内に STEC が存在するかどうかである。そこで、牛肝臓内に STEC が存在するかどうか、もし存在するとすればその汚染源はどこなのかを調べる目的で牛の各消化管部位における *stx* 遺伝子の分布について調べた。*stx* 遺伝子は唾液でも 22% で陽性となり第一胃内容物から肛門に近づくに従って陽性率は高くなった。肛門では内容物より組織の方でより高率に *stx* 遺伝子が検出された。しかしながら、胆汁では調べた 232 検体全て陰性であり、肝臓内部も生食用として提供されていた部位 1 と 2 では全て陰性、陽性となったのは加熱用として提供されていた部位 3-5 と外部からの汚染を受けやすい部位であった。実際、肝臓表面の汚染率は 8.8% と高く、部位 3-5 の汚染も門脈あるいは損傷を受けた部位から起こっていることも考えられる。すなわち、牛肝臓内の STEC 汚染は屠畜解体後の糞便汚染の影響を受けている可能性がある。一方、2 次増菌後に腸内細菌科菌群が検出された検体を用いても PCR 法

で *stx* 遺伝子が検出されなかったことから、肝臓内部(部位 1 と 2)における STEC 汚染の可能性は低いと予想される。

肝臓内の大腸菌群、腸内細菌科菌群を種々の消毒薬と凍結融解法を組み合わせることで各種消毒薬の殺菌効果を評価したところ、消毒薬の種類によって差が有ることがわかった。現状での塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせただけでは完璧ではないが、一連の処理後、腸内細菌科菌群を検査することにより、陰性となったものだけを流通させることができれば生レバーを提供できる可能性もゼロではない。生レバーを提供できる可能性を見いだすためにも、牛肝臓内での腸内細菌科菌群の分布、STEC が存在する可能性についてさらに検体数を増やして、データを積み上げて慎重に議論する必要がある。

放射線照射：先行研究(厚生労働科学研究 平成 24 年度 特別研究「食品に対する放射線照射による殺菌手法及び効果判定手法の開発並びに安全性に関する研究」)の結果から、当研究所が保有する *E. coli* O157 の中で、DT66 株が最もガンマ線照射に対する抵抗性が高いという結果が得られていた。また、これまでに報告されている牛挽肉の既存殺菌データと比較して抵抗性が異なる結果を得たため、これを被検菌として、ガンマ線による殺菌効果について、より詳細なデータ取得を試みた。

本研究で被験菌株に対して得た牛肝臓中でのガンマ線照射による D<sub>10</sub> 値は、牛

挽肉における  $D_{10}$  値に比較して高い値となった。本研究での牛挽肉の値は、既報の牛挽肉における  $D_{10}$  の範囲にあることから、実験は妥当に行なわれていると考えられ、牛挽肉中に比べて高い  $D_{10}$  値は、牛肝臓中というマトリクス環境によると考えられた。一般に細菌の放射線抵抗性は、ラジカルスカベンジャーの共存により上昇すると考えられている。牛肝臓中には、牛挽肉に比較してきわめて高い濃度のビタミン C やビタミン A が含まれており、他にも OH ラジカル等に対するラジカル補足活性を有する化合物が豊富に存在している可能性がある。本研究の結果から牛肝臓における、放射線抵抗性の増加に寄与する因子を具体的に特定することは出来ないが、過去の放射線生物学的な文献情報を考慮すると、牛肝臓中の成分に細菌に対する放射線殺菌の効果を低減する作用を持つものがあることが推察された。

牛肝臓を汚染する可能性がある、食中毒起因菌として、*E. coli* O157 の他には、*Campylobacter* 属菌や *Salmonella* 属菌の存在が懸念される。そこで、これらの菌についても、牛肝臓中におけるガンマ線殺菌効果を検討した。

*C. jejuni* の  $D_{10}$  値は大腸菌株よりも低い結果を得た。この菌種による違いは、過去の研究事例報告からも示唆された通りであった。なお、本研究で得られた牛挽肉中における *C. jejuni* の  $D_{10}$  値は、先行研究における値に比較して若干高めに観察されたが、この要因としては、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推察された。なお、本研究において、-80 で冷凍保存した検体では、凍結および解凍の時点で本菌の菌数が 1 ケタ低下したことから、冷凍保存された牛肝臓試料中の *Campylobacter* 属の殺菌には、ガンマ線に加えて凍結融解ストレスによる死滅の効果も加えて考慮することが出来ると考えた。以上のことから、牛肝臓においてはガンマ線抵抗性の試験指標菌として *C. jejuni* の挙動を詳細に検討する必要はないと考えた。

*Salmonella* 属菌は、本研究課題で検討した 3 つの菌種のうち、最も放射線抵抗性が強く、このことは、これまでに菌種による放射線抵抗性の違いについて緩衝液中や他の食品において報告されている結果と一致していた。本研究において、凍結下の *S. Enteritidis* IFO3313 株の牛肝臓中での  $D_{10}$  値は含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy と求められたことから、同条件下で *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、これは同菌株の生残曲線を指数関数型として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。実際の規定線量による *Salmonella* の殺菌効果確認試験を試みたところ、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、これを

不検出のレベルとするためには、 $5.5 \log$  CFU/g の菌数を低減することが理論上必要となる。本研究において得られた、*S. Enteritidis* IFO3313 株の生残曲線をシグモイド型であるとして、菌数の対数と線量の関係を二次曲線で回帰し、その回帰式に沿って計算した際の必要線量は、含気、脱気それぞれ 7.08 kGy および 7.12 kGy と算出された。従って、 $10^5$  CFU/g オーダーの *Salmonella* 接種による死滅効果確認試験の結果は、より多くの菌を接種して得た殺菌試験（生残曲線）の結果と照らし合わせて妥当なものと推察された。

本実験で検討した腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラいずれの菌種においても、牛肝臓中及び牛挽肉中での  $D_{10}$  値は、凍結状態（ $-80$ ）での照射の方が氷冷状態（ $0$ ）より大きく、また、脱気状態の方が含気状態より大きい結果となった。これは、放射線による微生物の死滅に、酸素が関与する水の放射線分解反応により生成する活性酸素種を介した間接的な反応が大きく寄与しているという、放射線の“間接効果”による解釈と矛盾しない結果である。間接効果に寄与する、活性酸素種の生成を妨げる低酸素状態や、生成した活性種の運動が制限される凍結状態では、殺菌効果が小さく（放射線が効きにくく）なることは、実用面において、目的とする殺菌効果を達成する上で、照射温度や包装条件に注意を要することを示唆している。

## 2. 照射による副生成物

放射線照射による食品成分の分解反応生成物は、加熱など他の食品加工処理の際に生成するものと共通しており、照射した食品の動物投与試験の結果も考慮し、「意図した技術上の目的を達成するために適正な線量を照射した食品は、いかなる線量でも適正な栄養を有し安全に摂取できる。」というのが、現在の国際機関の見解である。（WHO 1999）。一方で、近年、フランやアクリルアミドのように加熱調理や他の食品加工において非意図的に生成する化合物のリスクについての知見の集積も進んでいる。そこで本研究では、2011 年の EFSA の照射食品全般にかかる評価や、近年の FDA や FSANZ の個別の照射食品の評価で取り上げられている、脂質成分の変化（過酸化反応、トランス異性化、2-アルキルシクロブタノン類生成）、フランを着目すべき副生成物として、牛肝臓の照射における生成量を検討した。その際、最高線量は、氷冷（ $0$ ）6 kGy、凍結（ $-80$ ）10 kGy と、十分な殺菌効果の見込める条件を設定した。脂質の過酸化の指標である TBA 値については、氷冷含気包装の照射で増加したが、脱気包装や凍結下の照射では、著しい増加は認められなかった。

本研究における牛肝臓では脂質含量が約 5% であり、肝臓 100 g あたりに含まれるトランス脂肪酸の総量は、0.110 g / 100 g 生重量であった。これを凍結（ $-80$ ）状態で 10 kGy 照射すると、0.122 g / 100 g 生重量となり、肝臓 100g を摂取する場合、10 kGy 照射によって増加するトランス脂肪酸量は、元の含量の 10%、0.012g 程度と推察された。一方、

国際機関の推奨するトランス脂肪酸摂取量は総摂取エネルギーの1%未満とされており(WHO 2003)、1800 kcal 摂取する人のトランス脂肪酸摂取推奨量は2 g 未満となる。牛は反芻動物であり、肝臓も含めた牛肉中の脂肪には、一定量のトランス脂肪酸が含まれており、牛肉 100 g 中のトランス脂肪酸含量は、0.005 ~ 1.5 g / 100 g 生重量 の範囲にあると報告されている。(農林水産省 リスクプロファイル トランス脂肪酸

[http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk/analysis/priority/pdf/140214\\_tfa.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk/analysis/priority/pdf/140214_tfa.pdf) )

したがって、殺菌レベルの線量の照射による牛肝臓のトランス脂肪酸量の僅かな増加は、上記の国際機関の推奨値との比較において、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えるものではないと考えられる。

不飽和脂肪酸の含量については、常温(20 )で、6.74 kGy 以上を照射した牛肉でアラキドン酸(20:4)等の多価不飽和脂肪酸の含量の有意な低下も報告されているが(Li , 2012)しているが、本研究の照射条件の範囲内では、統計学的に有意な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。この化合物の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(EFSA 2011)。また、最近の論文では、2-dDCB および 2-tDCB の遺伝毒性を否定され(Yamakage 2014)、2-tDCB の発がんプロモーション活性も検出出来なかった(Sato 2015)とされている。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。

本研究の結果から、凍結状態の牛肝臓の照射では、10 kGy の照射において、牛肝臓 100g あたり 10 µg 程度の 2-ACBs が生成すると推察される。これまでの研究においては、6-8 で照射した牛肉の、2-dDCB, 2-tDCB、2-tDeCB の生成効率は、1.33, 1.59、1.67 nmol /mmole / kGy と報告されている(Marchioni 2009) 今回の肝臓の分析結果は、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ものと予測された。

フランについては、糖液や果汁の照射において生成が報告されている例があるが、今回の研究における牛肝臓試料の照射では、不検出（定量下限未満）であった。

高圧処理：500MPa の高圧処理による肝臓中の *E. coli* に対する不活化効果は認められるものの、肉質はかなり変性することが観察された。さらに最終的には腸管出血性大腸菌を用いた殺菌効果の検討も必要であると思われ、加圧処理を導入される場合は不活化データの構築も必要と考えられた。利用には効果的な加圧装置の改良と一貫した処理後の衛生管理の検討が必要であると考えられた。高圧条件を 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、2D 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。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-）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-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。

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は、過去の論文を参考に、300MPa、5分間の処理を6回反復させる条件での検討を実施した。この条件は、30分間1回の処理よりも殺菌効果が高いとされている。その結果、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が変わっており、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認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。

本研究で明らかになった結果から、今後牛肝臓を生食用として安全に提供するためには、肝臓における細菌汚染レベルを国内複数箇所における季節ごとの調査で明らかにし、その汚染レベルの低減に有効な非加熱殺菌法について放射線照射及び高圧処理を中心に検討し、そのレベルの処理における安全性や品質変化の評価を行う必要があると思われる。

## E. 結論

諸外国における畜産物生食実態の調査を行った結果、3地域9か国において、12種類の生食料理があることが示された。そのうちドイツのメットについては、容器に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。ドイツにおけ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ところ、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フランス、

ドイツ等で見られ、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。また、牛 6 頭の内臓及び筋肉における住肉胞子虫汚染率を調査したところ、100% から住肉胞子虫シストが検出された。こちらについても、今後病原性等の評価を行う必要があると思われた。

牛肝臓内の腸内細菌科菌群汚染は胆管あるいは血管を介していると考えられる。汚染率には季節性があり、冬場に少なく夏場に多い傾向であった。塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせることである程度の殺菌効果は認められたが、現状では十分でなく更なる検討が必要である。一方、胆汁や部位 1 と 2 からは *stx* 遺伝子は検出されず、肝臓表面や部位 3-5 から *stx* 遺伝子が検出されたことから、牛

肝臓内の STEC 汚染は屠畜解体後の糞便汚染が関係している可能性が考えられた。大腸菌群が高濃度に検出された検体があったことを踏まえつつ、今後、さらに検体数を増やして検討して行く必要がある。

牛肝臓中での腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラのガンマ線照射による殺菌効果について検討したところ、3 種の細菌の中では、サルモネラが最も放射線抵抗性が強く、次いで腸管出血性大腸菌、カンピロバクターとなった。サルモネラの中でも、放射線抵抗性が強い *S. Enteritidis* IFO3313 株を殺菌効果の指標として、凍結 (-80 °C、ドライアイス下) 条件下で、牛肝臓に接種した 10<sup>5</sup> CFU/g の菌数低減が可能なガンマ線の線量を確認したところ、含気包装条件では 7 kGy、脱気包装条件では、8 kGy の照射で、供試した 5 検体のすべてが陰性となった。

氷冷 6kGy、凍結 10 kGy までの牛肝臓のガンマ線照射で、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、トランス脂肪酸含量は僅かな増加、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 の線量依存的な生成を確認した。1 kGy の照射により前駆脂肪酸 1 nmole から生成する 2-アルキルシクロブタノン類はこれまで照射された畜肉中で報告されている値より小さいものであった。氷冷(0 °C)、凍結(-80 °C)の含気条件下で、十分な殺菌効果を得られる 6kGy、10 kGy でガンマ照射をしても、定量下限を超える濃度のフランは検出されなかった。

牛肝臓内部に接種した大腸菌に対する高圧処理の殺菌効果は、500MPa, 10分では5logの低減効果が見られたものの、肝臓の白化、硬化がみられた。

250MPa、180分の高圧処理は、培地中の食品媒介病原細菌の菌数低減には有効であった。牛肝臓に対する大腸菌効果は、2log程度であり、色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、品質変化は軽微であった。

鶏ササミ中のサルモネラ及びカンピロバクターに対する高圧処理の低減効果では、300MPa、5分を6回反復する処理において、肉色の白化、硬化が認められたものの、カンピロバクターについては7log以上の低減効果が認められた。サルモネラについては、平均して3log程度の低減効果であり、ばらつきが認められた。

#### F. 健康危機情報

牛の肝臓内部の生食用として提供されていた部位から直接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することができなかった。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お年寄りでは大きなリスクとなる可能性がある。

#### 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. 川崎 晋, 持田 麻里, 等々力 節子, 五十君 静信, 牛肝臓中における腸管出血性大腸菌のガンマ線照射による殺菌効果, 日本食品衛生学会第106回学術講演会

2. 等々力 節子, 都築 和香子, 亀谷 宏美, 齋藤 希巳江, 川崎 晋, 五十君 静信, 牛肝臓のガンマ線照射による品質変化, 日本食品衛生学会第106回学術講演会

3. 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

4. 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

特になし

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

総合分担研究報告書

諸外国における食肉の生食実態及び衛生管理実態に関する研究

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 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：諸外国における食肉及び内臓肉の生食実態と、生食による健康被害の実態を把握する目的で、文献調査、インターネット及び大使館への聞き取り調査を実施した。その結果、アジア地域で4件、ヨーロッパで5件、アフリカにおいて3件の生食料理が存在することが明らかになった。その多くは牛肉が原料であったが、豚、馬及び羊肉を原料とするものも1件ずつ見られた。容器に包装後、スーパー等で販売されている生食用食肉製品としてはドイツのメットがあった。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ところ、メットに対する特別な規格基準等は存在しておらず、食中毒リスクが高いと判断される食品については行政当局による監視指導の頻度を上げる手法により管理している他、製造者による自主規制を行っていることが示された。一方で、諸外国では生肉を原因食品とするサルモネラ、腸管出血性大腸菌、エルシニア、旋毛虫などの食中毒が発生していることも明らかとなった。

A. 研究目的

近年、日本国内では牛、馬、鶏などの生食が徐々に広がりを見せるようになり、それに伴ってこれらの生食による健康被害発生も知られるようになってきた。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、諸外国における食肉及び内臓肉の生食実態と、生食による健康被害の実態及び生食用食肉製造時の衛生管理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、諸外国における牛、豚、馬等の畜産物の生食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。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は、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、情報を収集した。

## C. 結果

### (1) 諸外国における畜産物生食実態

委託報告書を平成 25 年度報告書に示した。アジア地域で 4 件、ヨーロッパで 5 件、アフリカにおいて 3 件の生食料理が存在することが明らかになった。アジアでは、タイ、韓国及びトルコで牛の生食料理が、レバノンで羊の生食料理が存在していた。アフリカでは、エチオピアにおいて 3 種類の牛を原料とする生食料理が見られた。ヨーロッパにおいては、フランスで牛又は馬を用いる生食料理が存在し、チェコにおいても同様の牛の生食料理が見られた。イタリアでは 2 種類の牛の生食料理が存在していた。ドイツでは豚の生食製品（メット）が容器に包装され、販売されていることが明らかとなった。メットについては、ミュンヘンの 1 スーパーマーケット及びライプチヒの 3 スーパーマーケットにおける販売実態を調べたところ、ミュンヘンの 1 か所及びライプチヒの 2 か所において、それぞれ 3 種類以上のメットが冷蔵状態で販売されており、品質保持期限は販売時より 1 ~ 2 週間程度に設定されていた。

### (2) 生食料理或いは加熱不十分な肉料理の喫食による健康被害の実態

フランス及びドイツにおいて、畜産食品の生食による健康被害の報告が見られた。その原因物質は、毒素産生性大腸菌、サルモネラ、エルシニア、カンピロバクター、ボツリヌス菌、寄生虫（旋毛虫及

びサルコシステイス）、ノロウイルスであった。韓国においても、焼肉店における食中毒事例が見られたが、原因食品は特定されていなかった。

### (3) ドイツにおける畜産物製造上の衛生管理実態

委託報告書を平成 26 年度報告書に示した。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、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 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。「企業の種類(製品の取り扱い・製品のリスク)」「企業の様子(法令遵守・トレーサビリティ・従業員訓練)」「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)」「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。

#### (4) 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(平成26年度報告

書中委託報告書)。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

今回の調査により、海外において牛肉を中心として生食料理が存在することが示されたが、その大半はレストラン又は家庭において調理、喫食されるものであった。容器包装され、一般に流通される形で販売される生食製品としては、ドイツのメットのみが挙げられた。また、その品質保持期限は2週間以上と長いものであった。ドイツ国内におけるメットの製造基準、衛生管理手法及び微生物規格等の有無、それらの内容について情報収集を行うことで、国内の畜産食品の衛生管理及び規格基準設定の参考となり得ると思われることから、平成26年度にはその調査を実施した。その結果、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、近年においてもフランスで生牛挽肉及び生の馬肉等、ドイツで生豚挽き肉及び生ソーセージ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、それらの国で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

諸外国における畜産物生食実態の調査を行った結果、3地域9か国において、12種類の生食料理があることが示された。そのうちドイツのメットについては、容器に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。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ところ、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。また、製造者における自主管理も行われていた。

一方で、サルモネラ、大腸菌及び寄生虫等を主な原因物質とする健康被害の報告がフランス及びドイツ等で見られ、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は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 25 -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

総合分担研究報告書  
畜産食品における寄生虫性危害に関する研究

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）  
三井 太平 （岩手県食肉衛生検査所）

本分担研究は、畜産食品の安全性確保を大きな目的とし、平成 25 年から 27 年にて、以下の項目を検討した。1) 原因食品として畜産食品を含め、我が国における寄生虫性食中毒の、統計的実態を明らかにした。寄生虫性食中毒が項目化されていなかった平成 23 年までは、寄生虫性食中毒は「その他」の食中毒に分類されていた。そのほとんどはアニサキスだった。平成 24 年の統計項目改正以降は、クドアとアニサキスが主な原因になっている。寄生虫性食中毒は、我が国において第 3 の食中毒として位置づけられた。2) 食中毒として診断することを目的としている、馬肉を検査対象とした住肉胞子虫の検査法を、食中毒危害性を評価できる方法として使用可能か検証した。遺伝子検査法として定性 PCR が策定されているが、DNA を抽出する検体量が 0.3 g と少なく、ばらつきが多かった。定量 PCR 法を検討したが、やはり 0.3 g の検体量では遺伝子コピー数はばらつき、少なくとも 10 g 以上の馬肉から DNA を抽出すべきであることが明らかになった。3) 家畜だけでなく野生動物も畜産食品として流通する。その流通は、駆除とリンクし、今後増加する可能性がある。野生シカ肉について、住肉胞子虫寄生状況を調査した。市場流通しているエゾジカ肉 50 検体について、住肉胞子虫遺伝子検査を実施したところ、48 検体が陽性となり、広く住肉胞子虫のシカへの寄生が確認され、その危害性を評価する必要性が認められた。4) 住肉胞子虫は牛の多くの部位の筋肉中に存在した。現在まで、日本において住肉胞子虫が寄生する牛肉での食中毒の発生は報告されていないが、牛肉における胞子虫の寄生状況を把握し、その食中毒危害性を評価する必要がある。

A. 研究目的

畜産食品の安全性を担保するのに大きく貢献している組織に食肉衛生検査所お

よび食鳥検査所がある。同検査所は、法的には牛、豚、馬、羊、山羊の家畜、ならびに鶏、アヒル、鴨を、一頭一羽ず



つ検査している。実際の検査対象の多くは、牛、豚、および鶏になる。それらの家畜・家禽は、肉眼による検査および必要に応じた精密検査を経たのち、市場流通する。畜産食品を通じて人に危害性を示す物質や微生物が、検査所での精密検査をすり抜け、あるいは途中で混入し、さらには増殖などして、人が畜産食品を喫食し、食中毒が発生する。食中毒に関する公的な記録は、厚生労働省が所轄している食中毒統計になる。平成 24 年に原因物質の追加がされ、食中毒統計は刷新され、より正確な、我が国の食中毒発生状況が把握できるようになった。この追加の契機となった事象の一つに、馬肉食中毒の原因が発見されたことがある。馬肉の生食、すなわち馬刺しを喫食すると、短時間で、下痢嘔吐を示し、1 日あるいは数日で回復するという病型を示す「馬肉食中毒」は、馬の筋肉内に寄生する *Sarcocystis* 属住肉胞子虫という寄生虫が原因だった(1)。他に、原因が長く不明だったヒラメ食中毒が解析され、これもクドア属粘液胞子虫が原因物質であり(2) これらの事実に基づき、上記食中毒統計の変更、すなわち、寄生虫(クドア、サルコシスティス、アニサキス、その他の寄生虫)が病因物質の項目として追加された。

馬肉食中毒を診断する際、厚生労働省はその検査法を通知している(3)。*Sarcocystis fayeri* フェイヤー住肉胞子虫を、患者喫食馬肉から検出するのであるが、顕微鏡を用いての方法と、住肉胞

子虫に共通な、18S rRNA 遺伝子を標的とした定性 PCR 法が提示されていた。馬肉を喫食しての事例を、*Sarcocystis* 属寄生虫が原因であることを確定させる方法である。提示された方法は、事例の診断に適応させたもので、馬肉を含め、住肉胞子虫を含んだ畜産食品の、食中毒危害性を評価できる方法かは検証されていない。

住肉胞子虫は肉食動物を終宿主とし、草食動物あるいは豚のような雑食動物が中間宿主となって、その寄生環を維持している(図1)。住肉胞子虫は、その名が示すように、中間宿主の筋肉内に寄生する。終宿主に感染能力のある成熟虫体をブラディゾイトとよび、それが多数、袋に包まれて、筋肉内に存在する。袋はシストと称され、住肉胞子虫の種に応じた種々の個性ある構造を示す。畜産食品のもととなっている家畜には、住肉胞子虫が寄生する。家畜以外の野生動物も例外でなく、シカ、イノシシには住肉胞子虫の寄生が報告されている。

本研究は、畜産食品の安全性確保を大きな目的とし、以下の項目が具体的な目的となっている。

1) 原因食品として畜産食品を含め、我が国における寄生虫性食中毒の、統計的実態を明らかにする。平成 23 年までは寄生虫性食中毒が項目化されておらず、それは「その他」に分類されていた。平成 24 年度からは、届出があった中での実態が把握できるので、寄生虫性食中毒の位置づけを明らかにする。

2) 食中毒診断を目的としている馬肉を

検査対象とした住肉孢子虫の検査法を、食中毒危害性を評価できる方法として使用可能か、検証する。また、改良する。

3) 家畜だけでなく野生動物も畜産食品として流通する。その流通は、駆除とリンクし、今後増加する可能性がある。野生シカ肉について、住肉孢子虫寄生状況を把握する。

4) 住肉孢子虫が寄生する動物種は多い。中間宿主の一つとしてウシがある。現在まで、日本において牛肉に寄生する住肉孢子虫が原因で食中毒が発生した事例は報告されていない。牛肉における住肉孢子虫の寄生状況を把握する。

## B. 実験方法

### B-1 食中毒統計における寄生虫性食中毒

厚生労働省監視安全課食中毒被害情報管理室より、2003年から2012年までの、「その他」が原因物質の食中毒情報を、各事例について提供を受けた。

2003年から2012年の間に発生した食中毒について、事例数および患者数について解析した。食中毒統計において、総数、細菌、ウイルス、化学物質、その他、不明の項目について、年次推移を解析した。「その他」の占める割合について検討した。

「その他」について、原因物質項目2009年から2010年にかけて、ヒラメおよび馬肉食中毒の原因が明らかになり、情報が周知され始めた。厚労省に届け出される記述には形式が指定されておらず、同一性がない。解析のため、適切な「整

理項目名」を定め、記述のものと解析用の項目名を対比して示した。

### B-2 馬肉と *S. fayeri* 遺伝子検査法

厚生労働省が通知した検査法(3)に従い、馬肉各検体から0.3g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、1mLにメスアップした後、30秒間激しく攪拌、3000rpmで5~6秒間、遠心分離した。上清200μLを取り、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen)を用いてDNAを抽出した。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℃、3分を1ステップ、94℃、30秒、53℃、30秒、1分を30サイクル、72℃、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。

同じそれぞれの検体から、馬肉を10g、2か所採取し、ぶつ切りにしたものにPBS 30mLを加え、ホモジナイザー (Excel Auto Homogenizer, Nissei)で均質化した。均質化後、粥状になった馬肉サンプルを200μL採取し、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen)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製した(表1)。また、定量PCRのPCR条件は95℃、10分

を1ステップ、95℃、30秒、60℃、1分を45サイクルとした。用いた試薬はGeneAmp SYBR qPCR Mix (NIPPON GENE)である。StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

#### B-3 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。

#### B-4 牛肉における住肉胞子虫検査

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ヵ月齢、すべてメスであった。各牛からそれぞれ筋肉8~9ヵ所、計52ヵ所を採材した。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。

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。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をシストとして確認し計数した。

厚生労働省が通知した、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法(3)を牛肉に応用した。住肉胞子虫の18S rRNA遺伝子を標的とした定性PCRを実施した。

### C. 結果

#### C-1 「その他」に分類される食中毒の位置づけ、その原因物質の分析

寄生虫性食中毒が包有される「その他」に分類される食中毒は、2007年までは年間で一桁の発生件数を示したにすぎない。2008および2009年は17件と、いずれも少ない発生数になっている。2010年に28件となり、増加傾向を示し、2011年は68、2011年に至っては100件を超える事件数を示した。ヒラメ及び馬肉食中毒の原因が明らかになったこともあり、2010から2011年を境に、急激な「その他」の食中毒が増加していることが読み取れる(表2)。

10年間で266件の発生がみられているが、そのうち、寄生虫が原因となっているのは258件あり、97%を占めた。細菌性、毒素性、混合した原因によって「その他」に分類された食中毒はわずかに3%に過ぎなかった。

2003年から2010年までは、3事例を除き、すべてが、アニサキス属が原因となっていた。2011年になると、アニサキス属を超えるクドアの報告、また、サルコシスティスが原因になっている事例の発生がみられている。2012年は、アニサキスは倍増し、また、クドアも発生件数が増加した(表3)。

#### C-2 馬肉の住肉胞子虫遺伝子検査法改良の検討

*S. fayeri* の18S rRNA遺伝子を標的とする定量PCRを行った。馬肉0.3g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4)。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。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(図2)。

#### C-3 エゾシカ肉における住肉胞子虫汚染状況

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。

#### C-4 牛肉中の住肉胞子虫の顕微鏡および遺伝子検査

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3)。シストの形態は *S. cruzi* を推定させた。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、1 cm<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。

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。馬肉について検討された現行法を応用したところ、約 1,100 bp の DNA の増幅が確認された。DNA サイズが同様に、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た住肉胞子虫の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。

牛肉中の住肉胞子虫について、顕微鏡による検査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、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果が大きくかい離していた。

#### D. 考察と結論

畜産食品の寄生虫に関連する危害性の分析を行った。

食中毒統計が改正される平成 23 年までは、寄生虫性食中毒は「その他」に分類されていた。個票を検索してその他を分析したところ、97%が寄生虫を原因としていて、そのほとんどがアニサキスだった。統計の項目の改正後は、アニサキスが原因の食中毒が増加していたとともに、クドアが原因である事例も多く発生していた。アニサキス食中毒は、単に発生が増加しているとは考えにくい。寄生虫性食中毒に関心が集まり、医師、保健所および衛生検査所の担当員による、検査体制の整備と精度が向上し、アニサキス食中毒事件数の実態が把握できている可能性がある。事件数においては、寄生虫性食中毒は、ウイルス性、細菌性に次いで多く発生している食中毒となっている。

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。

コンピュータソフト上で、20、30、あるいは 40 g と、検体の重量を増やし、同様な解析を行ったところ、ばらつきは減少した。検体量の増加は、可食部を少なくすることに直結し、また、作業上の困難さを増やすので、適正な判断が要

求される。

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。実際、加熱が不十分のエゾシカ肉を喫食して、有症苦情事例が発生し、患者喫食エゾシカ肉中には住肉胞子虫が検出されていることを踏まえて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(4)。

現行の馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法を、牛肉に適応し、その妥当性を検討した。

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。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。

牛肉中の住肉胞子虫についての遺伝子検査法を検討した。馬肉を対象とした現行法を応用した場合、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、牛肉にも適応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、適応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ず、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。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、DNAを抽出する検体の量を増加させ。また、定量性のある遺伝子検査法の必要性が示唆された。

平成26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、大量の検体を均質化することの有効性を示した。牛肉についても、*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。*S. cruzi*の病原性に関する知見の集積も今後必要である。

#### E. 参考文献

- 1) Kamata, Y., Saito, S., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, T., Inui, T., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y. 2014. A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. J. Food Prot. 77, 814-819.
- 2) Kawai, T., Sekizuka, H., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. 2012. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. Clin. Infect. Dis. 54, 1046-1052.
- 3) *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)
- 4) 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.

#### 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。





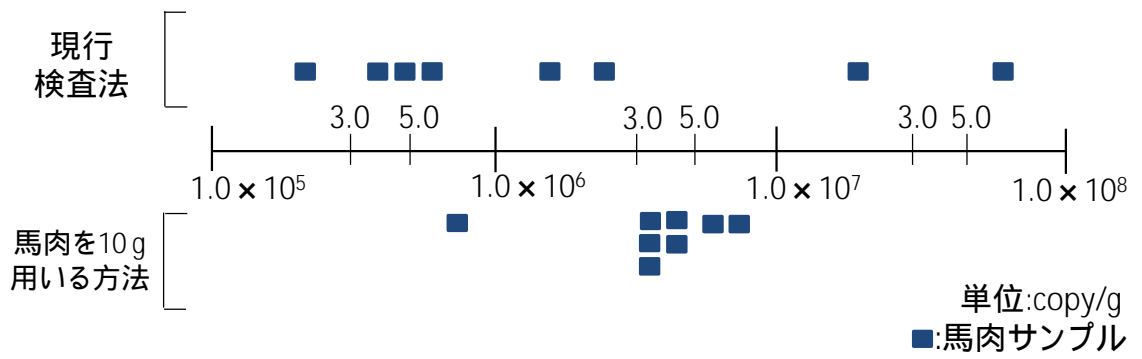


図2 . 現行検査法および馬肉 10 g 用いる方法での定量 PCR の結果のばらつき



図3 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。

表 1 . 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2 厚生労働省食中毒統計 事件数の推移

	事件数									
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
総数	1,585	1,666	1,545	1,491	1,289	1,369	1,048	1,254	1,062	1,100
細菌	1,110	1,152	1,065	774	732	778	536	580	543	419
ウイルス	282	277	275	504	348	304	290	403	302	432
化学物質	8	12	14	15	10	27	13	9	12	15
自然毒	112	151	106	138	113	152	92	139	69	97
その他	1	5	8	7	8	17	17	28	68	107
不明	72	69	77	53	78	91	100	95	68	30

表3 寄生虫性食中毒の発生件数の推移

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
寄生虫性	1	5	7	5	7	14	17	28	67	107
アニサキス属	1	4	7	5	6	14	16	28	32	65
クドア	0	0	0	0	0	0	0	0	33	41
サルコシステイス	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
ウェステルマン肺吸虫	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
旋尾線虫	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

表 4 . 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		
	2*	Undetected		11651	7277790	141.1%
3	1*	7015800		13265600		
	2*	4330920	1898497	20798400	5326494	31.4%
4	1*	4370520		13830400		
	2*	6993360	1854628	14838400	712763.6	5.0%

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

平成 25-27 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：牛消化管内の大腸菌群の分布を調べたところ、牛の唾液から肛門に至る各部位で 100%検出され、肛門に近づくに従いその菌数は多くなった。牛胆汁および牛肝臓内の大腸菌群の分布は相関性のある場合とない場合があった。肝臓内で細菌が検出された場合、その多くは胆管であったが、一部類洞でも検出された。牛の肝臓内を 5 カ所に分け大腸菌群の分布を調べた結果、陽性率は部位 1 と 2 (生食用として提供されていた) と比べ、部位 3-5 (加熱用として提供されていた) の方が高く、冬場よりも夏場の方が高かった。種々の消毒薬を用いて牛肝臓内の大腸菌群あるいは腸内細菌科菌群に対する殺菌効果を調べたところ、消毒薬と凍結融解を組合せることにより、部位 1 と 2 から冬場：50-60%、夏場：40%で腸内細菌科菌群が検出されなかった結果が得られた。6 肝臓検体を増菌培養し PCR 法で *stx* 遺伝子を検出したところ、部位 3-5 と肝臓表面では *stx* 遺伝子が検出されたが、部位 1-2 からは *stx* 遺伝子は検出されなかった。

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。しかし、生レバーの需要は大きく、生レバーの復活を求める人も少なくない。一方、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。

本研究では、牛肝臓内の大腸菌群の分布を明らかにし、その殺菌法を開発することを目的として以下の実験を行った。すなわち、牛肝臓内の STEC を含む大腸菌群 (乳

糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性好気性又は通性嫌気性桿菌で、マッコニキー寒天培地でコロニーを形成する菌) あるいは腸内細菌科菌群 (グラム陰性の通性嫌気性桿菌でブドウ糖を発酵し酸とガスを産生する菌で、VRBG 寒天培地でコロニーを形成する菌) の汚染は胆管を經由していると仮定し、塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせた殺菌法を開発を試みた。屠畜解体後の牛肝臓内の大腸菌群の分布、唾液、胆汁を含む牛消化管内での大腸菌群と STEC の分布を調べた。開発した殺菌法で屠畜解体後の牛肝臓内の腸内細菌科菌群の殺菌を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 牛消化管、肝臓、唾液及び胆汁中の大腸菌群の菌数

牛肝臓から無菌的に約 50 g の組織を切り出しストマック袋に入れ、等量の滅菌 PBS を加えストマック処理を行った。その他表 1 に示した消化管組織と内容物は、それぞれ 10 g を取りだし、組織は等量の滅菌 PBS を加えストマック処理を、内容物は 90 ml の滅菌 PBS に懸濁した。唾液は 5 mL、胆汁は 10 mL 採取した。それぞれ処理後の液、唾液と胆汁を滅菌 PBS で 10 倍段階希釈し、SMAC 寒天培地に植菌し STEC の有無及び大腸菌群の菌数を調べた。

### 2. 牛肝臓から分離した細菌の菌種同定

牛肝臓内から分離した細菌からボイル法で鋳型 DNA を調製し、16S rRNA 遺伝子、約 500 bp を増幅できるプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を精製後、塩基配列を解析し菌種を同定した。

### 3. 組織化学的解析による牛肝臓内の細菌汚染部位の同定

牛肝臓約 10 g を切り出し、直ちに中性の 10% のホルマリン溶液に浸漬した。プロセッサを用いて組織を固定化し、パラフィンで包埋後、マイクロームカッターで厚さ約 3  $\mu$ m の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色後、顕微鏡にて細菌汚染を確認した。

### 4. 牛消化管、肝臓内、胆汁における *stx* 遺伝子の検出

屠畜解体直後に採取した舌、第一胃内容

物、十二指腸、十二指腸内容物、盲腸、盲腸内容物、肛門、肛門内容物をそれぞれ約 10 g、肝臓 (部位 1-5) を 50 g (又は 100 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。肝臓表面は滅菌スワブで約 400 cm<sup>2</sup> を拭き取り、スワブを 5 mL の PBS に懸濁し、ストマッカー処理検体を含めそれぞれから 1 mL を取り、1.25 倍の TSB 4 mL に加え、37°C、18 時間、浸透培養した。2015 年 10 月以降は、50 g の肝臓に TSB 50 mL を加えストマック処理し、その後、TBS 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。唾液と胆汁についてもそれぞれ 1 mL を同様に培養した。増菌後、牛肝臓以外は培養液 100  $\mu$ L を 900  $\mu$ L の滅菌 TE buffer (pH 8.0) に加え、100°C、10 分間の加熱処理後、遠心分離を行い得られた上清を PCR 用の鋳型 DNA とした。牛肝臓検体は、増菌培養後 1 mL を遠心分離し、ペレットを回収した。ペレットに 1 mL の TE を加え 100°C、10 分間加熱処理し、遠心上清を鋳型 DNA として PCR に供した。

*stx* 遺伝子検出用の PCR 法は Pal らの方法に準じて行った (Indian J. Med. Res., 110: 83-85, 1999)。得られた PCR 産物は 3% アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV 照射下で特異的な遺伝子の増幅を確認した。

### 5. 種々の塩素系消毒薬の殺菌効果の比較

#### 5-1. 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、各種塩素系・非塩素系消毒薬を、胆管を通じて肝臓内に注入し、洗浄、殺菌した。尚、



消毒薬 A は電解水、B、C、D は非塩素系消毒薬、E は塩素系消毒薬を用いた。その後、図 6 に示したように肝臓を 5 つの部位、すなわち、部位 1-5 からそれぞれ約 50 g (2014 年 10 月より 2015 年 3 月まで) あるいは 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 で希釈後 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。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。ストマッカー処理した液を BPW 培地で増菌した培養液を VRBG 寒天培地に植菌し  $37^{\circ}\text{C}$  で一晚培養した。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  $37^{\circ}\text{C}$  で一晚培養した。

#### 5-2 : 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、肝臓左葉に関しては 10 カ所から 2.5 g ずつ採取し合計 25 g を  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結後、チルド条件で融解し、上記と同様に処置した。

### C. 研究結果

#### 1 . 牛消化管、肝臓、唾液及び胆汁中の大腸菌群菌数

牛消化管内、肝臓、唾液及び胆汁の大腸菌群の菌数について 2012 年 11 月から 2014

年 8 月まで調べた結果を図 1 に示した。唾液、第一胃、十二指腸、盲腸、肛門内容物の菌数はそれぞれ  $10\sim 10^{10}$  CFU/g であった。一方、肝臓内を 5 つの部位に分けて調べた結果、部位 1 と 2 では、それぞれ 22%、33% で陽性となり、菌数も  $10\sim 10^6$  CFU/g であった。部位 3-5 では 60% 前後の陽性率で、菌数は  $10\sim 10^4$  CFU/g であった。胆汁の陽性率は 11% であったが、菌数は  $10^5\sim 10^8$  CFU/ml と高かった。胆汁中の菌数が多い検体は、肝臓内の菌数も多かった。しかしながら、胆汁からの細菌が検出限界以下 ( $10 > \text{CFU/mL}$ ) の検体でも、肝臓内から細菌が検出される場合もあった。

牛肝臓の各部位における夏場の大腸菌群陽性率は冬場よりも高かった (図 2、3)。例えば部位 3-5 は、冬場は 40-50% であったが、夏場の陽性率は 80% 前後であった。一方、部位 1 と 2 では、夏場の陽性率はそれぞれ 32%、46% であったが、冬場はそれぞれ 13%、25% であった。肝臓内で検出された大腸菌群の菌数は季節に関係なく胆汁で高濃度の菌が検出された場合を除けば、部位 1 と 2 では  $10^2$  CFU/g 以下、部位 3-5 では  $10^3$  CFU/g 以下であった。Sawdust Liver (鋸屑肝) についても同様に調べた結果、部位 1 と 2 の大腸菌群の陽性率は 50% と 60%、部位 3-5 の陽性率は 80-85% と共に高かった。菌数も  $3.3\sim 10^7$  CFU/g が検出され、Sawdust Liver では大腸菌群の陽性率のみならず菌数も多かった (図 4)。

#### 2 . 牛肝臓から分離された細菌の菌種同定

牛肝臓内から分離した菌の 16S rRNA 遺伝子約 500 bp の塩基配列を解析した結果、*Escherichia* sp, *Klebsiella* sp, *Serratia* sp,

*Citrobacter* sp 等腸内細菌科に属する細菌として同定された。

### 3. 牛肝臓内の細菌汚染部位の同定

69 検体の肝臓の細菌汚染部位を組織化学的に調べた結果、13 検体で胆管内又は門脈 / 類洞内に細菌が検出された。胆管内に検出された 1 例を図 5-1 に、類洞内に検出された 1 例を図 5-2 に示した。類洞内に細菌が検出された場合、図 6 に示した部位 3-5 の加熱用として提供されていた部位がほとんどであるが、まれに 1 と 2 の生食用として提供されていた部位からも検出された。しかしながら細菌が検出された周辺部位にマクロファージの集積や炎症が認められなかったことから屠畜解体後に何らかの理由で肝臓内が汚染された可能性も考えられる。

### 4. 牛消化管、肝臓内、唾液及び胆汁における *stx* 遺伝子の検出

牛消化管、肝臓から *stx* 遺伝子を PCR 法で検出した結果を表 1 にまとめた。胆汁では調べた 232 検体全てで検出されなかった。肝臓の内部 (253 検体) と表面 (181 検体) からは、それぞれ 1.2%、8.8% の割合で検出された。舌の陽性率は 6.5%、唾液は 22%、第一胃内容物は 8.7%、十二指腸は内容物で 15%、組織で 5.9%、盲腸は内容物・組織とも 26%、肛門は内容物で 45%、組織で 83% と第一胃から肛門に近づくに従い陽性率は上昇し、肛門においては内容物よりも組織での陽性率の方が高かった (表 1)。

一方、肝臓の部位別で見ると、0.5 g/1.0 g 相当の増菌培養液から肝臓内部の部位 1 (201 検体) と 2 (205 検体) すなわち生食用として提供されていた部位からは

*stx* 遺伝子は検出されなかったが、加熱用として提供されていた部位 3 (200 検体)、4 (191 検体)、5 (191 検体) からはそれぞれ 1、3、1 検体から *stx2* 遺伝子が検出された。肝臓表面では 133 検体中 9 検体から *stx2* 遺伝子が、1 検体から *stx1/2* 遺伝子が検出された。Sawdaust Liver では肝臓内部と胆汁それぞれ 20 検体について調べた結果、部位 3 と 5 のそれぞれ 1 検体で *stx2* 遺伝子が検出された (表 2)。さらに、50 g 相当の肝臓を増菌培養した検体では、調べた 48 検体全てで左葉 (生食用として提供されていた部位 1 と 2)、右葉 (加熱用として提供されていた部位 3-5)、胆汁では調べた 36 検体全てで *stx* 遺伝子は検出されなかった (表 3)。一方、肝臓表面からは 6 検体で *stx2* 遺伝子が検出された。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。

### 5. 塩素系消毒薬の牛肝臓内大腸菌群、腸内細菌科菌群に対する殺菌効果

#### 5-1. 肝臓を 5 つの部位に分けた場合の大腸菌群細菌数と塩素系消毒薬の殺菌効果

5 種類の消毒薬 (2 種類の塩素系 [消毒薬 A と E] と 3 種類の非塩素系 [消毒薬 B、C、D]) の殺菌効果を調べた結果を表 4 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 での大腸菌群陽性率は 26% と 23%、消毒薬 E の場合、それぞれ 0% で、消毒薬 B-D の場合、それぞれ 0% と比べて低かった。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、消毒薬と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5に示した。凍結融解後2次増菌した場合、生食用として提供されていた部位1と2とで冬場では40-48%、夏場では60%で腸内細菌科菌群が検出された。言い換えれば、それぞれ50-60%、40%では腸内細菌科菌群が全く検出されなかった。一方、消毒薬B、C、Dでは凍結融解後の腸内細菌科菌群の陽性率が90-100%であった。

#### 5-2：肝臓を左葉、右葉で分けた場合

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左葉（部位1と2）と加熱用として提供されていた右葉（部位3-5）に分け、2.5gを10カ所から採取した結果を表6にまとめた。最も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、すなわち、2,000ppmと500ppmで評価した。その結果、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。凍結することで左葉の陽性率は33%まで下がったが、2次増菌を行うと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（表6）。しかしながら、消毒薬Eを用いた場合、凍結無しで左葉の陽性率は8%であったのに対し右葉では33%であった。左葉では凍結後、2次増菌を行うことで陽性率は50%となった。

#### D. 考察

牛の肝臓内から検出される大腸菌群の由来を調べる目的で、牛の消化管内、胆汁、

牛肝臓内の大腸菌群細菌の分布について調べた。その結果、唾液から肛門に至るまで調べた全ての部位から大腸菌群は検出された。大腸菌群の菌数は、第一胃から肛門に近づくに従い増加した。一方、胆汁の陽性率は11%で、肝臓内の陽性率は22%から63%と胆汁よりも高い陽性率を示した。このことは胆汁が必ずしも肝臓内の大腸菌群の汚染源となっていない可能性を示している。但し、高濃度の大腸菌群が胆汁で検出された場合、肝臓内でも比較的高濃度の大腸菌群が検出されたので胆汁も主要な汚染源の1つであることに間違いはない。一方、大腸菌群が検出された肝臓の切片を作製し、組織化学的に肝臓内での菌の汚染部位を調べたところ、一つは胆管、もう一つは門脈や類洞等の血管で検出された。すなわち、胆管以外にも血管が汚染源となっている可能性が示唆された。肝臓を牛個体から切り離した際、門脈の切断部位は肝臓表面に露出しており、部位3-5は損傷を受けている場合も多々あり、門脈を含め損傷を受けた部位を介して汚染する可能性は十分あると考えられる。したがって、屠畜解体後の肝臓の内部が汚染しないよう門脈部分の衛生的な取り扱いが重要である。

牛肝臓内の大腸菌群の陽性率及び菌数を季節別に解析した結果、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3-5とも夏場でそれぞれ32-46%、77-81%であるのに対し、冬場ではそれぞれ13-25%、42-50%であった。胆汁中に大腸菌群が高濃度で検出された場合を除けば、季節に関係なく肝臓内の大腸菌群の菌数は部位1と2（生食用として提供されていた）で $10^2$  CFU/g以下、部位3-

5 (加熱用として提供されていた)では  $10^3$  CFU/g 以下であった。一方 Sawdust Liver では、部位 1 と 2 の大腸菌群の陽性率は 50-60%、部位 3-5 で 80-85%と高い値となり、さらに、汚染菌数も胆汁からの汚染の影響を受けているとはいえ  $10^4$  から  $10^7$  CFU/g と高い値を示した (図 4)。牛肝臓内から分離した大腸菌群の 16S rRNA 遺伝子を解析し菌種を同定した結果、*Escherichia* 属、*Citrobacter* 属、*Klebsiella* 属、*Serratia* 属菌であった。このことは、肝臓内の細菌汚染は腸管内あるいは胆汁を介している可能性が強く示唆された。

最も重要な点は、牛肝臓内に STEC が存在するかどうかである。そこで、牛肝臓内に STEC が存在するかどうか、もし存在するとすればその汚染源はどこなのかを調べる目的で牛の各消化管部位における *stx* 遺伝子の分布について調べた。*stx* 遺伝子は唾液でも 22%で陽性となり第一胃内容物から肛門に近づくに従って陽性率は高くなった。肛門では内容物より組織の方でより高率に *stx* 遺伝子が検出された。しかしながら、胆汁では調べた 232 検体全て陰性であり、肝臓内部も生食用として提供されていた部位 1 と 2 では全て陰性、陽性となったのは加熱用として提供されていた部位 3-5 と外部からの汚染を受けやすい部位であった。実際、肝臓表面の汚染率は 8.8%と高く、部位 3-5 の汚染も門脈あるいは損傷を受けた部位から起こっていることも考えられる。すなわち、牛肝臓内の STEC 汚染は屠畜解体後の糞便汚染の影響を受けている可能性がある。一方、表 2 で示した結果は、0.5 g/1 g 当たりで検出されたかどうか、表 3 に示した結果では 50 g 当たり検出されたかどう

かという結果である。スパイク実験を行い、それぞれの検出下限を調べた結果、0.5 g/1 g では 62 CFU/50 g、50 g では 6.2 CFU/50 g であった。一方、2 次増菌後に腸内細菌科菌群が検出された検体を用いても PCR 法で *stx* 遺伝子が検出されなかったことから、肝臓内部 (部位 1 と 2) における STEC 汚染の可能性は低いと予想される。

肝臓内の大腸菌群、腸内細菌科菌群を種々の消毒薬と凍結融解法を組み合わせることで各種消毒薬の殺菌効果を評価したところ、消毒薬の種類によって差が有ることがわかった。現状での塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせただけでは完璧ではないが、一連の処理後、腸内細菌科菌群を検査することにより、陰性となったものだけを流通させることができれば生レバーを提供できる可能性もゼロではない。生レバーを提供できる可能性を見いだすためにも、牛肝臓内での腸内細菌科菌群の分布、STEC が存在する可能性についてさらに検体数を増やして、データを積み上げて慎重に議論する必要がある。

## E. 結論

牛肝臓内の腸内細菌科菌群汚染は胆管あるいは血管を介していると考えられる。汚染率には季節性があり、冬場に少なく夏場に多い傾向であった。塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせることである程度の殺菌効果は認められたが、現状では十分でなく更なる検討が必要である。

一方、胆汁や部位 1 と 2 からは *stx* 遺伝子は検出されず、肝臓表面や部位 3-5 から *stx* 遺伝子が検出されたことから、牛肝臓内の STEC 汚染は屠畜解体後の糞便汚染が関

係している可能性が考えられた。大腸菌群が高濃度に検出された検体があったことを踏まえつつ、今後、さらに検体数を増やして検討して行く必要がある。

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お年寄りでは大きなリスクとなる可能性がある。

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することができなかった。現状では、牛の肝

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願，登録状況

無し

表 1 . 牛の各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	3 (6.5)
唾液 [41]	1	3	5	9 (22)
胆汁 [232]	0	0	0	0 (0)
肝臓内部 [253]	0	3	0	3 (1.2)
肝臓表面 [181]	0	15	1	16 (8.8)
第一胃内容物 [46]	2	1	1	4 (8.7)
十二指腸組織 [68]	1	2	1	4 (5.9)
十二指腸内容物 [68]	2	6	2	10 (15)
盲腸組織 [69]	4	12	2	18 (26)
盲腸内容物 [69]	4	12	2	18 (26)
肛門組織 [220]	10	116	56	182 (83)
肛門内容物 [65]	6	16	7	29 (45)

表 2 . 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)

	正常 (%)				Sawdust (%)
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/2</i>	合計	<i>stx2</i>
部位 1	0 <sup>§</sup> /201 <sup>#</sup> (0)	0/201 (0)	0/201 (0)	0/201 (0)	0/20 (0)
部位 2	0/205 (0)	0/205 (0)	0/205 (0)	0/205 (0)	0/20 (0)
部位 3	0/200 (0)	1*/200 (0.5)	0/200 (0)	1/200 (0.5)	1/20 (5)
部位 4	0/191 (0)	3*/191 (1.6)	0/191 (0)	3/191 (1.6)	0/20 (0)
部位 5	0/191 (0)	1*/191 (0.5)	0/191 (0)	1/191 (0.5)	1/20 (5)
肝臓表面	0/133 (0)	9/133 (6.8)	1/133 (0.8)	10/133 (7.5)	ND
胆汁	0/196 (0)	0/196 (0)	0/196 (0)	0/196 (0)	0/20 (0)
肛門組織	7/190 (3.7)	104/190 (55)	155/190 (23)	155/190 (82)	ND

\*1 検体で、部位 3、4、5 全てで *stx2* 遺伝子が陽性となった。#総検体数、§陽性検体数

表 3 . 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	肝臓左葉 (%)	肝臓右葉	肝臓表面	胆汁	肛門組織
<i>stx1</i>	0 (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 <sup>§</sup> /48 <sup>#</sup> (0)	0/48 (0)	6/48 (13)	0/36 (0)	27/30 (90)

#総検体数、§陽性検体数

表 4 . 各種消毒薬で殺菌消毒した場合の部位ごとの肝臓内大腸菌群陽性率

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 <sup>#</sup> (0)
D## [9]	5 (56)	6 (67)	7 (88)	9 (100)	9 (100)	0 (0)
E <sup>§§</sup> [14]	0 (0)	0 (0)	13 (93)	11 (79)	12 (86)	0 (0)

調査時期:\*H27/1-H27/9, \*\*H27/5-H27/8, \*\*\*H27/6-H27/8, ##H27/8-H27/9, §§H26/10-H26/12,

#総検体数, §陽性検体数

表5 . 部位1と2を各種消毒薬で消毒後、凍結無・有、凍結後2回増菌後の細菌陽性率

消毒薬	部位1 (%)			部位2		
	凍結無+	凍結有+	凍結2次増菌&	凍結無+	凍結有+	凍結2次増菌&
A## [25#]	ND	2 (8)	10 (40)	ND	1 (4)	12 (48)
A* [30]	13 (43)	11 (37)	18 (60)	12 (40)	8 (27)	18 (60)
B** [16]	12 (75)	9 (56)	15 (94)	11 (69)	9/15# (60)	15/15# (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)
E <sup>ss</sup> [14]	0 (0)	NA	10 (71)&&	0 (0)	NA	13 (93)##

調査時期：##H27/1-H27/3, \*H27/4-H27/9, \*\*H27/5-H27/8, \*\*\*H27/6-H27/8, ##H27/8-H27/9, <sup>ss</sup>H26/10-H26/12, +大腸菌群, &腸内細菌科菌群, #総検体数、&&凍結後BPWによる1次増菌の結果

表6 . 各種消毒薬の部位ごとの肝臓内大腸菌群、腸内科細菌菌群の殺菌効果

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

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

図1. 牛肝臓及び消化管各部位における大腸菌群細菌の検出率と細菌数(通年)

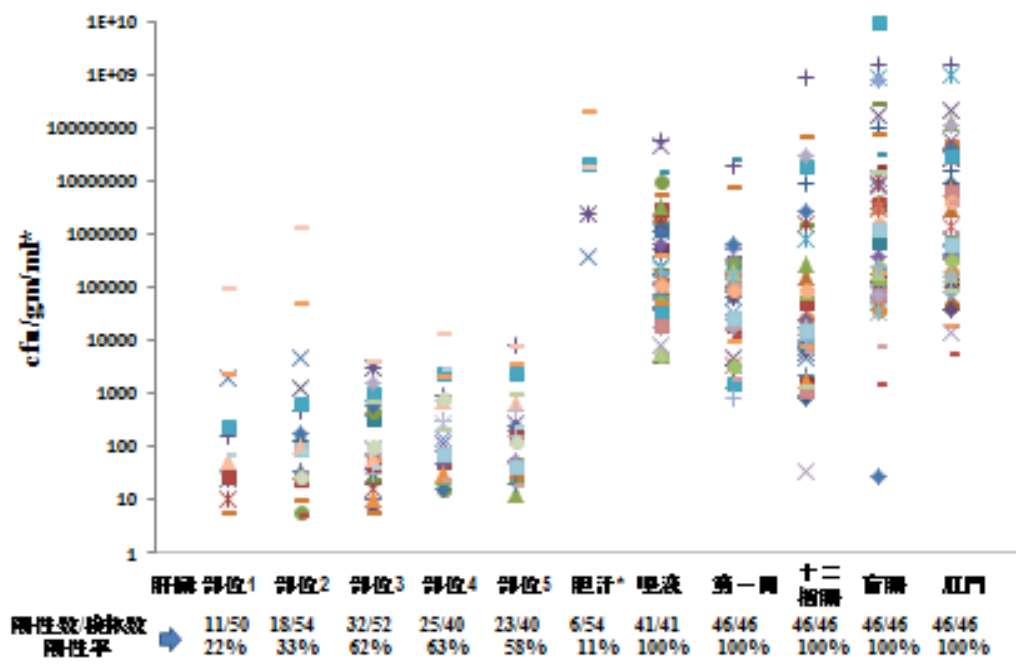
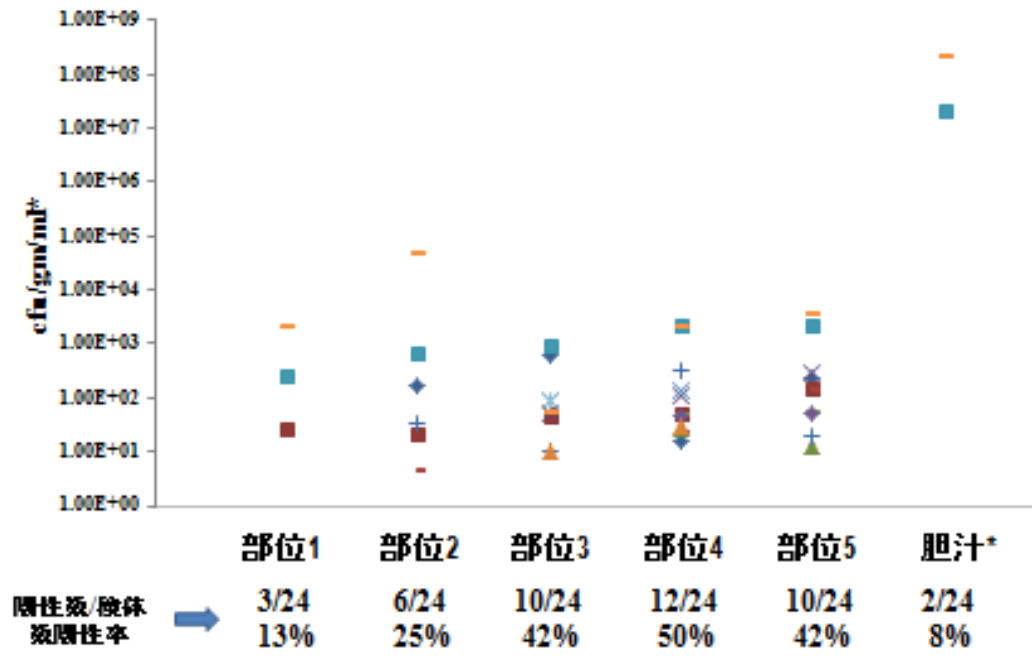




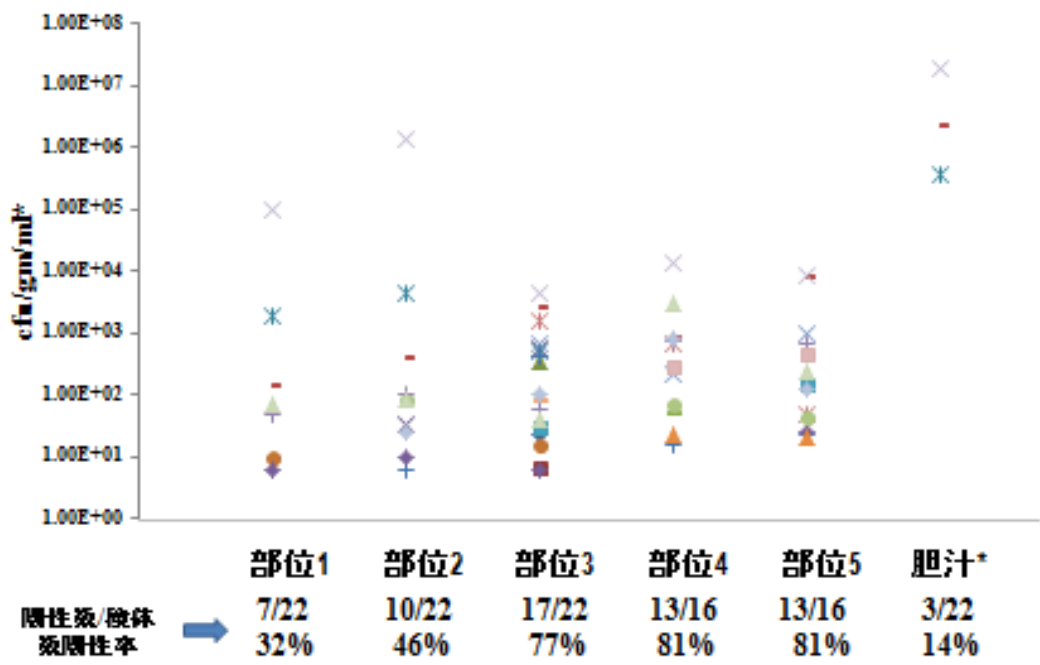
図2. 冬場の牛肝臓内における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数  
(2013年10月-2014年3月)



64



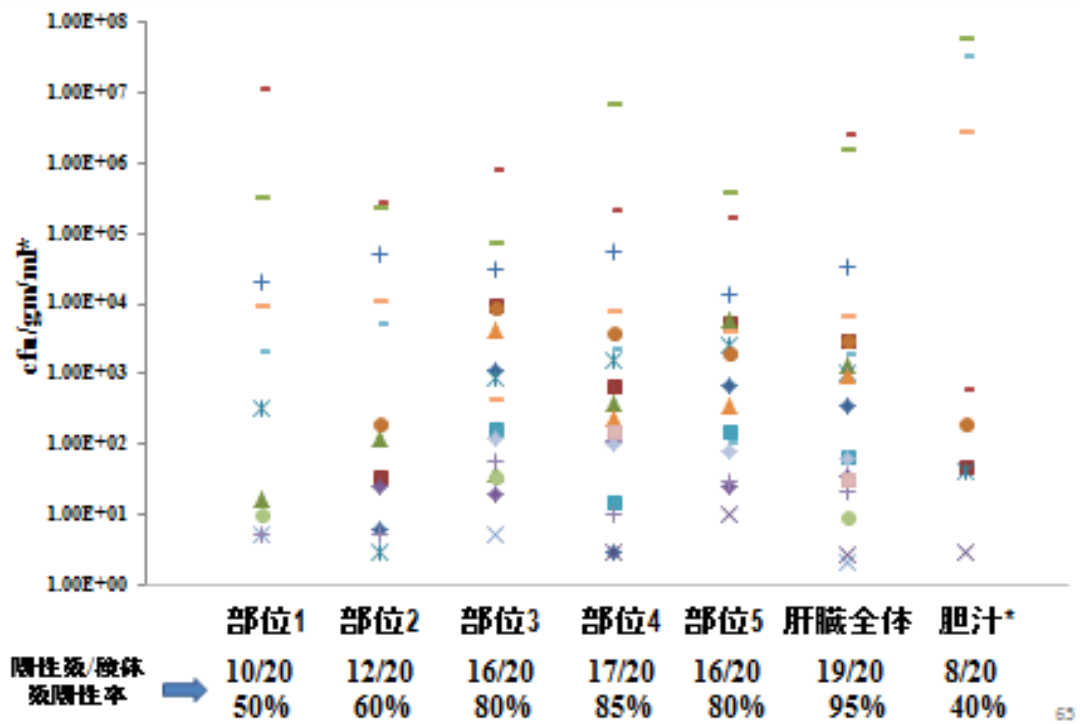
図3. 夏場の牛肝臓内における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数  
(2013年5月-9月、2014年4月-8月)



63



図4. Sawdustの牛肝臓における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数  
(2013年9月~2014年4月)



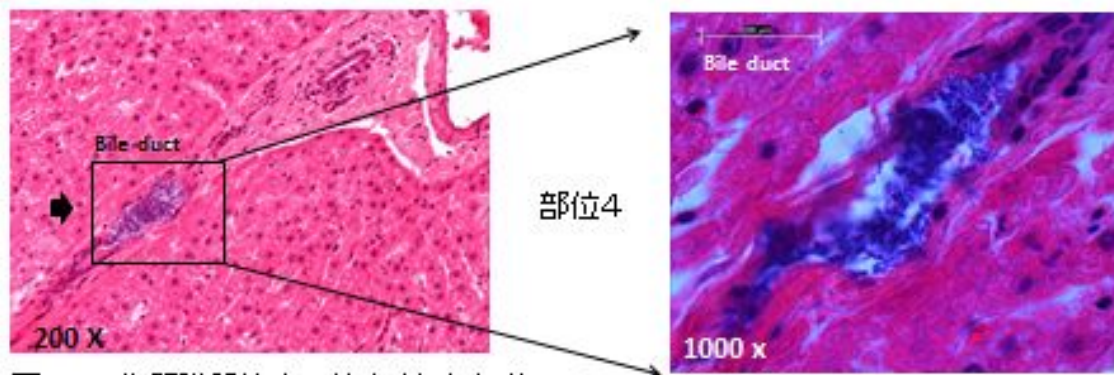


図5-1. 牛肝臓胆管内に検出された細菌

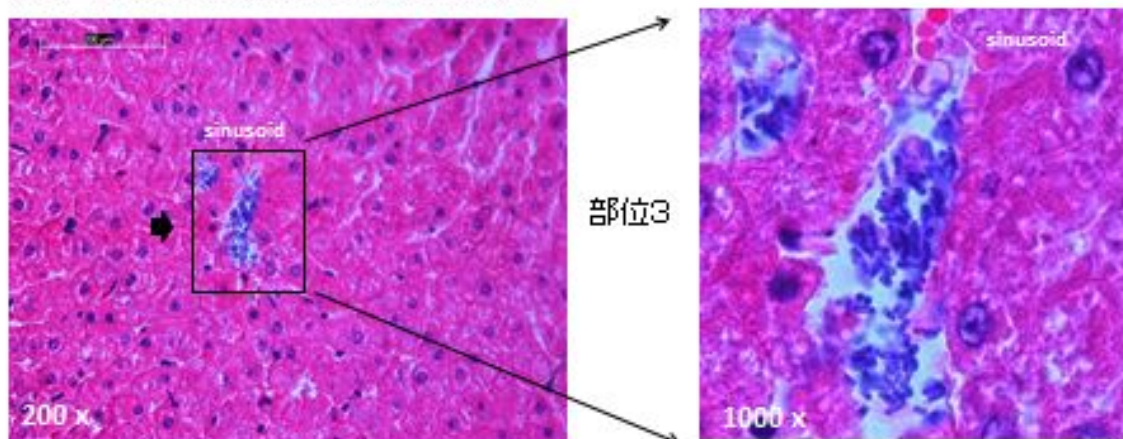


図5-2. 牛肝臓類洞内に検出された細菌

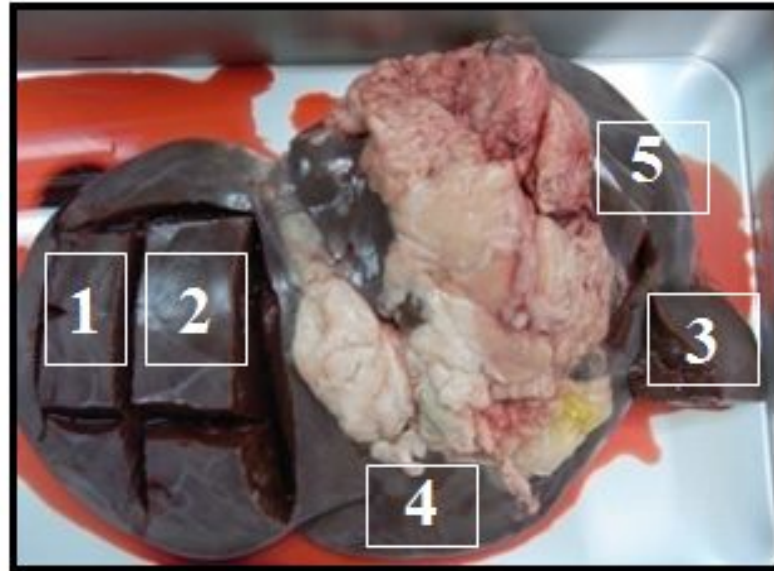


図6. 牛肝臓から採取した部位(1-5)を示す  
左葉(部位1と2)、右葉(部位3-5)

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

総合分担研究報告書

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

研究協力者：都築 和香子 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究所

研究要旨：

牛肝臓中での腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラのガンマ線照射による殺菌効果について、照射時の温度（氷冷・凍結）と包装条件（含気・脱気）を変えて検証を行った。牛肝臓中での *E. coli* O157 DT-66 株の  $D_{10}$  値は、氷冷（0℃）含気条件で 0.36 kGy、脱気条件で 0.38 kGy、凍結（-80℃）含気条件で 0.80 kGy、脱気条件で 0.96 kGy であった。ガンマ線に対する菌株の感受性の違いを、*Salmonella* Enteritidis および *S. Typhimurium* の複数株について検討したところ、リン酸緩衝液中での抵抗性は *S. Enteritidis* IFO3313 株が最も高かった。*S. Enteritidis* IFO3313 株を、牛肝臓中に接種した際の生残曲線から求めた  $D_{10}$  値は、氷冷（0℃）含気条件で 0.62 kGy、脱気条件で 0.63 kGy、凍結（-80℃）含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy で、*E. coli* O157 より抵抗性が強かった。牛肝臓内部に接種した *Campylobacter jejuni* 5096 株の  $D_{10}$  値として、氷冷（0℃）脱気条件で 0.33kGy、凍結（-80℃）脱気条件で 0.69 kGy を得た。凍結融解によって *C. jejuni* は 1桁程度の死滅があ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。最終的に、*S. Enteritidis* IFO3313 株を  $10^5$ CFU/g 接種した検体について、6、7、8 kGy の 3 段階の線量のガンマ線を照射して死滅効果を確認したところ、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）。

照射による副生成物について検討を行い、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)、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)が、氷冷(0℃) 6 kGy、凍結(-80℃)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。前駆脂肪酸 1 mmole から 1 kGy の照射で生成する 2-ACBs 量は、1 nmole 未満で、これまで畜肉等で報告されている値より小さかった。また、氷冷(0℃) 6 kGy、凍結(-80℃) 10 kGy までの照射により、包装条件によらず、トランス脂肪酸が線量に依存して僅かに増加した。一方、脂質酸化の指標である TBA 値は、含気包装、0℃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℃)の照射では、ほとんど変化が無かった。フランについては、氷冷(0℃)、

凍結（-80℃）の照射で、それぞれ6 kGy、10 kGy 照射をしても検出されないことを確認した。さらに、照射により肝臓中に増加する可能性のある臭気成分の探索を行い、可能性のある物質としてベンジルメルカプタン、フェニエチルアルコール、スカトールを検出した。

#### 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した。

3年間の研究期間において、牛肝臓を汚染する可能性のある食中毒起因菌として、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラの3種に着目して、これらを牛肝臓内部に接種した際のガンマ線による殺菌

効果を検討するとともに、照射により牛肝臓中に生成する可能性のある副生成物について検討を行った。

#### 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℃で凍結保存した。

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50 g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、氷冷（0℃）照射では照射氷中に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 *Escherichia coli* O157 DT66 株（stx-1, 2 陰性）、*Salmonella* Enteritidis (IFO3313、他牛糞便由来株4株) および *S. Typhimurium* (IFO12529、他牛糞便由来株2株)、*Campylobacter jejuni* 5096 株を用いた。

*E. coli* および *Salmonella* は、Trypticase Soy Broth (Difco)を用いて、37℃ 一昼夜振とう培養した後、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。*C. jejuni* 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。それぞれの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 $10^9$ ~ $10^{10}$  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℃)および凍結(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。

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. 牛肝臓の殺菌試験

菌体の接種は、自然解凍後した 25 g 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、氷水中あるいは、-80℃の凍結庫内で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。

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

ガンマ線照射後の牛肝臓は、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。

*E. coli* および *Salmonella* の計数は、各10倍段階希釈試料液を、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、これを35℃で24時間培養し、その出現集落数から1g当たりの一般生菌ならびに腸内細菌科の菌数を求めた。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、標的菌種であることをPCR法もしくはイムノクロマト法にて確認した。

*C. jejuni* の計数は、10倍段階希釈試料液をmCCDA平板(Oxoid)にスパイラルプレーティング法で塗抹した。mCCDA平板は41.5℃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。

別途、*Salmonella* の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、37 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、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. 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、クロロホルム/メタノールにより総脂質を抽出した。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、ガスクロマトグラフにより分析した。(詳細条件は、平成 26 年度分担研究報告書参照)

#### 8. 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、クロロホルム/メタノール (2:1) (C/M) 溶液で、脂質を

抽出し、これを、アセトニトリルに再溶解させた後、1g のシリカゲルカラム (Merck Shilica gel 60 70-230 mesh) 2 本に添加し、精製したものを GC-MS の分析試料とした。内部標準としてシクロヘキシルシクロヘキサノンを用い、規定濃度の 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) にマトリックスを添加した標準溶液で作成した検量線を用いて定量した。(試料調製の手順と GC-MS による分析条件の詳細は、本研究の平成 27 年度分担研究報告書参照)

#### 9. フランの分析

フランの分析は、Yoshida 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。ガスバリア性のポリエチレンバック (PTS 袋、三菱ガス化学製、PB180250P 90 × 120mm) 含気状態で包装した牛肝臓 (50g 程度) 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 (約 4 ) 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 4g を入れた 20 ml ヘッドスペースバイアルに 1g 採取した。(分析条件の詳細については、平成 26 年分担研究報告書を参照)

#### 10. 臭気成分の分析

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 )、または 6kGy (-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。

異臭分析は、大和製罐(株)総合研究所に依頼して実施した。解凍直後の試料(40g)を細かく刻み、純水(300mL)とともに減圧蒸留(55 90hPa)し、留分をジエチルエーテルで抽出して濃縮後、臭い嗅ぎ GC 及び GC-MS で分析した。(詳細条件は H25 年度分担研究報告書参照)

## C. 研究結果

### 1. 各種細菌に対するガンマ線の殺菌効果

#### 1.1 *E. coli* O157

牛肝臓および牛挽肉中に、*E. coli* O157 DT66 株を接種し、段階的に線量を変えて照射し、生残曲線を得た。牛肝臓及び挽肉中の DT66 株は、氷冷条件(0 )0~3 kGy、凍結条件(-80 )0~5 kGy の範囲で、線量に対して指数関数的に減少し、生残菌数の線量に対するプロットは、ほぼ直線となった。このプロットの傾きから、D<sub>10</sub> 値を求めた結果は、平成 25 年度報告書分担研究報告書 表 1 に示した。牛肝臓内部に接種した *E. coli* O157:H7 DT-66 株の D<sub>10</sub> 値は、氷冷(0 )含気条件で 0.36 kGy、脱気条件で 0.38 kGy、凍結(-80 )含気条件で 0.80 kGy、脱気条件で 0.96 kGy であった。氷冷・凍結もしくは含気・脱気包装いずれの試験区においても、牛肝臓におけるガンマ線殺菌では牛挽肉と比較して高い線量を必要とする結果となった。特に凍結下では挽肉と比較して D<sub>10</sub> 値が高く算出された。また、氷冷区と凍結区を比較した場合、凍結区の D<sub>10</sub> 値の方が高く観測された。さらに含気包装区と真空包装区においても比較

したところ、殺菌のためには真空包装区の方が含気包装区と比較して高い線量が必要であった。

#### 1.2 *Salmonella*

サルモネラ供試菌 8 株に対し、リン酸緩衝液中におけるガンマ線の感受性について比較したところ、1 kGy 照射後の生残率は *S. Enteritidis* IFO3313 株が供試菌株の中で最も高かった(平成 25 年 分担研究報告書 図 1)。そこで、この株を被検菌として選択し、以降の実験に用いた。

*S. Enteritidis* IFO3313 株を被検菌として、牛肝臓および牛挽肉中に接種し、ガンマ線照射を行った際の生残曲線は、低線量域で肩が見られるシグモイド型となったが、(平成 25 年度分担研究報告書 図 2)、便宜的に指数関数型であるとして D<sub>10</sub> 値を、直線回帰より求めた。(平成 25 年度分担研究報告書 表 2 および 平成 27 年度分担研究報告書 表 1)。研究期間を通じての結果を統合すると *S. Enteritidis* IFO3313 株を、牛肝臓中での D<sub>10</sub> 値は、氷冷(0 )含気条件で 0.62 kGy、脱気条件で 0.63 kGy、凍結(-80 )含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy と求められた。これらの値は、前項で示した *E. coli* O157 の値よりも高く、サルモネラの殺菌にはより大きな線量が必要であった。また、*E. coli* O157 と同様、牛肝臓におけるガンマ線殺菌では牛挽肉と比較して高い線量を必要とする結果となった。照射温度、包装条件による放射線感受性の違いについても、*E. coli* O157 と同様、凍結下、脱気条件の方が、放射線抵抗性が強く(D<sub>10</sub> が大きく)なった。

#### 1.3 *Campylobacter*

牛肝臓および牛挽肉中において *C. jejuni*

5096 株を接種し、ガンマ線照射を行った際の D<sub>10</sub> 値を求めた（平成 26 年度分担研究報告書 表 1）。*C. jejuni* の牛肝臓中の D<sub>10</sub> 値は、氷冷（0）含気条件で 0.26 kGy、脱気条件で 0.33 kGy、凍結（-80）含気条件で 0.58 kGy、脱気条件で 0.69 kGy であり、大腸菌株よりも低い結果を得た。また、牛肝臓における D<sub>10</sub> 値はいずれの条件においても、牛挽肉中での値よりも大きかった。なお、-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。

#### 1.4 ガンマ線による *Salmonella* 死滅効果

前項までで最も放射線抵抗性が強いと考えられた *S. Enteritidis* IFO3313 株を約 10<sup>5</sup> 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 となるようガンマ線照射した場合の不活性化について検討を行った。各条件における、5 検体中の検出（陽性）数は、平成 27 年分担研究報告書 表 2 に記載した。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。なお、本試験にて接種した菌数は 3.0 × 10<sup>5</sup> CFU/g と求められた。

## 2. 牛肝臓のガンマ線照射による副生成物

### 2.1 TBA 価

牛肝臓を含気あるいは脱気条件で包装し、氷冷（0）で 3、6 kGy、凍結状態（-80）で 5、10 kGy のガンマ線照射を行い、脂質の過酸化と相関があるとされる TBA 価を測定した。含気包装では、氷冷（0）照射において TBA 価の線量に応じた有意な増

加が認められた。含気包装、凍結状態（-80）の照射においても統計的に有意な TBA 価の増加がみられたが、その変化量は非常に小さかった。また、脱気包装では、氷冷、凍結照射ともに、最高線量の照射でも有意な TBA 価の増加は認められなかった。（H26 年度分担研究報告書 表 3）

### 2.2 脂肪酸組成、トランス脂肪酸含量

前項と同様の照射条件において、主な脂質構成脂肪酸の含量を測定した。供試した牛肝臓には、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 などの炭素数 18 (C18) のトランス異性体の他、C14~C17 のモノエンのトランス異性体も非照射及び照射のいずれの検体にも含まれていた。照射による不飽和脂肪酸の有意な減少は、いずれの検体においても認められなかった。（H26 年分担研究報告書 表 3）

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、6 kGy の照射では 18:1 および 18:2 のトランス異性体の総量や C18 のトランス異性体の総量、より短鎖のトランス異性体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。脱気包装、0、6 kGy 照射における、C18 総トランス脂肪酸の含量は、1.40 ± 0.03 g / 100 g 脂質（非照射コントロールは 1.04 ± 0.08 g / 100 g 脂質）その他の脂肪酸も合わせた総トランス脂肪酸量は、2.51 ± 0.10 g / 100 g 脂質（非照射

コントロールは  $2.18 \pm 0.12$  g /100 g 脂質) となった。また、凍結下の照射でも氷冷下に比べ変化量は小さいものの照射によるトランス異性体の増加の傾向が認められた。脱気包装 10kGy での増加量は統計的に有意で、C18 総トランス脂肪酸の含量は、 $1.26 \pm 0.05$  g / 100 g 脂質、その他の脂肪酸も合わせた総トランス脂肪酸量は、 $2.42 \pm 0.10$  g / 100 g 脂質であった。なお、本研究で使用した牛肝臓の脂質含量は、5.03 g / 100 g 生肝臓重量 であった。含気包装と脱気包装の同一温度、同一線量での間のトランス異性体含量を比較しても、統計的な有意差は認められず、TBA 価の場合と異なり、包装条件の違いによる影響はほとんど認められなかった。(H26 年分担研究報告書 表 2)

### 2.3 2-アルキルシクロブタノン類

肝臓成分の寄与による分解反応を考慮して、抽出溶媒をクロロホルム/メタノールとし、定量時にマトリックス検量線を用いる方法により、照射した牛肝臓(凍結(-80 ) 照射、5、10 kGy、氷冷(0 ) 照射 3、6kGy )において、3種の 2-ACBs( 2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCB)の定量を実施した。添加回収試験による回収率は 73~116%で、繰り返し標準偏差は 6%未満であった。非照射の肝臓には、いずれの 2-ACBs も検出されず、照射した肝臓では、パルミチン酸由来の 2-dDCB、ステアリン酸由来の 2-tDCB、オレイン酸由来の 2-tDeCB が線量に依存して生成し、たとえば含気包装、凍結状態 (-80 ) 10 kGy における、含量は、 $10.3 \pm 0.30$ 、 $30.7 \pm 0.5$ 、 $55.5 \pm 1.6$  ng /g 生重量であった。他の条件の照射においても、照射肝臓中の 3種の 2-ACBs の含量は、元の脂質の脂肪酸組成を反映し、

2-tDeCB、2-tDCB、2-dDCB の順に高い含量の 2-ACBs が検出された。(詳細生成量については H27 分担研究報告書 表 4 参照) 肝臓生重量 1g・1 kGy あたりの生成量は、2-tDCB が 2-dDCB 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。前駆脂肪酸 1 mmole あたり 1 kGy の照射で生成する 2-ACBs の分子数は、0.3~0.9 nmole 程度であった。(H27 分担研究報告書 表 5 参照)

### 2.4 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 0.5ng/g であった。牛肝臓を分析した結果、照射(6 kGy 0、10 kGy -80 )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。

### 3. ガンマ線照射による臭気成分

牛肝臓試料から減圧蒸留により抽出した臭気成分をにおい嗅ぎ GC (GC-O) で分析した結果と GC-MS による分析の結果を統合し、照射試料(含気包装 0 3 kGy、および-80 6 kGy)において、照射により増加する臭気成分としてベンジルメルカプタンが示唆された。なお、GC-MS 分析において、これらの化合物の該当ピークは非照射のコントロール試料においても検出された。(H25 分担研究報告書 図 3、4)

#### D. 考察

先行研究(厚生労働科学研究 平成 24 年度 特別研究「食品に対する放射線照射による殺菌手法及び効果判定手法の開発並びに安全性に関する研究」)の結果から、当研究所が保有する *E. coli* O157 の中で、DT66 株が最もガンマ線照射に対する抵抗性が高いという結果が得られていた。また、これまでに報告されている牛挽肉の既存殺菌データと比較して抵抗性が異なる結果を得たため、これを被検菌として、ガンマ線による殺菌効果について、より詳細なデータ取得を試みた。

本研究で被験菌株に対して得た牛肝臓中でのガンマ線照射による D<sub>10</sub> 値は、牛挽肉における D<sub>10</sub> 値に比較して高い値となった。本研究での牛挽肉の値は、既報の牛挽肉における D<sub>10</sub> の範囲にあることから、実験は妥当に行なわれていると考えられ、牛挽肉中に比べて高い D<sub>10</sub> 値は、牛肝臓中というマトリクス環境によると考えられた。一般に細菌の放射線抵抗性は、ラジカルスカベンジャーの共存により上昇すると考えられている。牛肝臓中には、牛挽肉に比較してきわめて高い濃度のビタミン C やビタミン A が含まれており、他にも OH ラジカル等に対するラジカル補足活性を有する化合物が豊富に存在している可能性がある。本研究の結果から牛肝臓における、放射線抵抗性の増加に寄与する因子を具体的に特定することは出来ないが、過去の放射線生物学的な文献情報を考慮すると、牛肝臓中の成分に細菌に対する放射線殺菌の効果を低減する作用を持つものがあることが推察された。

牛肝臓を汚染する可能性がある、食中毒起因菌として、*E. coli* O157 の他には、*Campylobacter* 属菌や *Salmonella* 属菌の存在が懸念される。そこで、これらの菌についても、牛肝臓中におけるガンマ線殺菌効果を検討した。

*C. jejuni* の D<sub>10</sub> 値は大腸菌株よりも低い結果を得た。この菌種による違いは、過去の研究事例報告からも示唆された通りであった。なお、本研究で得られた牛挽肉中における *C. jejuni* の D<sub>10</sub> 値は、先行研究における値に比較して若干高めに観察されたが、この要因としては、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推察された。なお、本研究において、-80 で凍凍保存した検体では、凍結および解凍の時点で本菌の菌数が 1 ケタ低下したことから、凍凍保存された牛肝臓試料中の *Campylobacter* 属の殺菌には、ガンマ線に加えて凍結融解ストレスによる死滅の効果も加えて考慮することが出来ると考えた。以上のことから、牛肝臓においてはガンマ線抵抗性の試験指標菌として *C. jejuni* の挙動を詳細に検討する必要はないと考えた。

*Salmonella* 属菌は、本研究課題で検討した 3 つの菌種のうち、最も放射線抵抗性が強く、このことは、これまでに菌種による放射線抵抗性の違いについて緩衝液中や他の食品において報告されている結果と一致していた。本研究において、凍結下の *S. Enteritidis* IFO3313 株の牛肝臓中での D<sub>10</sub> 値は含気条件で 1.43 kGy、脱気条件で 1.58 kGy と求められたことから、同条件下

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、これは同菌株の生残曲線を指数関数型として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。実際の規定線量による *Salmonella* の殺菌効果確認試験を試みたところ、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、これを不検出のレベルとするためには、 $5.5 \log$  CFU/g の菌数を低減することが理論上必要となる。本研究において得られた、*S. Enteritidis* IFO3313 株の生残曲線をシグモイド型であるとして、菌数の対数と線量の関係を二次曲線で回帰し、その回帰式に沿って計算した際の必要線量は、含気、脱気それぞれ 7.08 kGy および 7.12 kGy と算出された。従って、 $10^5$  CFU/g オーダーの *Salmonella* 接種による死滅効果確認試験の結果は、より多くの菌を接種して得た殺菌試験（生残曲線）の結果と照らし合わせて妥当なものと推察された。

本実験で検討した腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラいずれの菌種においても、牛肝臓中及び牛挽肉中での  $D_{10}$  値は、凍結状態（-80℃）での照射の方が氷冷状態（0℃）より大きく、また、脱気状態の方が含気状態より大きい結果となった。これは、放射線による微生物の死滅に、酸素が関与する水の放射線分解反応により生成する活性酸素種を介した間接的な反応が大きく寄与しているという、放射線

の“間接効果”による解釈と矛盾しない結果である。間接効果に寄与する、活性酸素種の生成を妨げる低酸素状態や、生成した活性種の運動が制限される凍結状態では、殺菌効果が小さく（放射線が効きにくく）なることは、実用面において、目的とする殺菌効果を達成する上で、照射温度や包装条件に注意を要することを示唆している。

## 2. 照射による副生成物

放射線照射による食品成分の分解反応生成物は、加熱など他の食品加工処理の際に生成するものと共通しており、照射した食品の動物投与試験の結果も考慮し、「意図した技術上の目的を達成するために適正な線量を照射した食品は、いかなる線量でも適正な栄養を有し安全に摂取できる。」というのが、現在の国際機関の見解である。（WHO 1999）。一方で、近年、フランやアクリルアミドのように加熱調理や他の食品加工において非意図的に生成する化合物のリスクについての知見の集積も進んでいる。そこで本研究では、2011 年の EFSA の照射食品全般にかかる評価や、近年の FDA や FSANZ の個別の照射食品の評価で取り上げられている、脂質成分の変化（過酸化反応、トランス異性化、2-アルキルシクロブタノン類生成）フランを着目すべき副生成物として、牛肝臓の照射における生成量を検討した。その際、最高線量は、氷冷（0℃）6 kGy、凍結（-80℃）10 kGy と、十分な殺菌効果の見込める条件を設定した。脂質の過酸化の指標である TBA 値については、氷冷含気包装の照射で増加したが、脱気包装や凍結下の照射では、著しい増加は認められなかった。

本研究における牛肝臓では脂質含量が約5%であり、肝臓100gあたりに含まれるトランス脂肪酸の総量は、0.110g/100g生重量であった。これを凍結(-80℃)状態で10kGy照射すると、0.122g/100g生重量となり、肝臓100gを摂取する場合、10kGy照射によって増加するトランス脂肪酸量は、元の含量の10%、0.012g程度と推察された。一方、国際機関の推奨するトランス脂肪酸摂取量は総摂取エネルギーの1%未満とされており(WHO 2003)、1800kcal摂取する人のトランス脂肪酸摂取推奨量は2g未満となる。牛は反芻動物であり、肝臓も含めた牛肉中の脂肪には、一定量のトランス脂肪酸が含まれており、牛肉100g中のトランス脂肪酸含量は、0.005~1.5g/100g生重量の範囲にあると報告されている。(農林水産省 リスクプロファイル トランス脂肪酸 [http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk\\_analysis/priority/pdf/140214\\_tfa.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/140214_tfa.pdf))したがって、殺菌レベルの線量の照射による牛肝臓のトランス脂肪酸量の僅かな増加は、上記の国際機関の推奨値との比較において、一日のトランス脂肪酸摂取量に大きな影響を与えるものではないと考えられる。

不飽和脂肪酸の含量については、常温(20℃)で、6.74kGy以上を照射した牛肉でアラキドン酸(20:4)等の多価不飽和脂肪酸の含量の有意な低下も報告されているが(Li, 2012)しているが、本研究の照射条件の範囲内では、統計学的に有意な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。この化合物の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(EFSA 2011)。また、最近の論文では、2-dDCBおよび2-tDCBの遺伝毒性を否定され(Yamakage 2014)、2-tDCBの発がんプロモーション活性も検出出来なかった(Sato 2015)とされている。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。

本研究の結果から、凍結状態の牛肝臓の照射では、10kGyの照射において、牛肝臓100gあたり10μg程度の2-ACBsが生成すると推察される。これまでの研究においては、6-8℃で照射した牛肉の、2-dDCB、2-tDCB、2-tDeCBの生成効率は、1.33、1.59、1.67 nmol/mmole/kGyと報告されている(Marchioni 2009)今回の肝臓の分析結果は、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ものと予測された。

フランについては、糖液や果汁の照射において生成が報告されている例があるが、今回の研究における牛肝臓試料の照射では、不検出（定量下限未満）であった。

#### E. 結論

牛肝臓中での腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラのガンマ線照射による殺菌効果について検討したところ、3種の細菌の中では、サルモネラが最も放射線抵抗性が強く、次いで腸管出血性大腸菌、カンピロバクターとなった。サルモネラの中でも、放射線抵抗性が強い *S. Enteritidis* IFO3313 株を殺菌効果の指標として、凍結（-80℃、ドライアイス下）条件下で、牛肝臓に接種した 10<sup>5</sup> CFU/g の菌数低減が可能なガンマ線の線量を確認したところ、含気包装条件では 7 kGy、脱気包装条件では、8 kGy の照射で、供試した 5 検体のすべてが陰性となった。

氷冷 6kGy、凍結 10 kGy までの牛肝臓のガンマ線照射で、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、トランス脂肪酸含量は僅かな増加、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 の線量依存的な生成を確認した。氷冷(0℃)、凍結(-80℃)の含気条件下で、十分な殺菌効果を得られる 6kGy、10 kGy でガンマ照射をしても、定量下限を超える濃度のフランは検出されなかった。

F. 健康危機情報  
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)

講演・研修会等

1. 川崎 晋, 持田 麻里, 等々力 節子, 五十君 静信, 牛肝臓中における腸管出血性大腸菌のガンマ線照射による殺菌効果, 日本食品衛生学会第 106 回学術講演会
2. 等々力 節子, 都築 和香子, 亀谷 宏美, 齋藤 希巳江, 川崎 晋, 五十君 静信, 牛肝臓のガンマ線照射による品質変化, 日本食品衛生学会第 106 回学術講演会
3. 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
4. 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





畜産食品の安全性確保に関する研究

分担研究報告書

高圧処理による畜産食品中の食中毒原因菌の不活化に関する研究

分担研究者	荻原 博和	日本大学生物資源科学部
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	鈴木 穂高	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	阿部 申	日本大学生物資源科学部
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

研究要旨：牛肝臓中の食中毒菌に対し、加熱によらない殺菌処理を行う目的で、静水圧を利用した高圧処理を実施し、牛肝臓に接種した大腸菌の不活化効果を検討した。その結果、菌懸濁液を用いた試験では、400MPa、10 分の処理で 5D の低減効果が得られた。大腸菌を接種した肝臓を用いた試験では、500MPa、10 分処理で 5D の低減効果が得られ、有効な不活化効果が認められた。しかしながら、肝臓の色彩と硬度に大きな変化がみられたため、条件の再検討を実施した。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ところ、250MPa、180 分の処理で牛肝臓の変色、硬化が比較的抑制された。一方、菌数低減は 2D にとどまった。硬化の原因の探求を目的として実施した組織学的検討の結果、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ものの、肝細胞の細胞質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。更に超微細形態学的変化について検討したところ、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。

また、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がしばしば起こっているため、高圧処理を用いた鶏ササミ中の食中毒原因菌の低減についても検討した。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、肉色は白化及び硬化する傾向を示した。組織学的解析では、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おり、筋線維のそれぞれが若干縮小していた。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、高圧処理により畜産食品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。

今後、十分な菌数低減効果を持ちつつ、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

食品や食材の殺菌には一般に加熱処理が行われており、食品の安全性向上に貢献している。一方で食材は加熱処理により、その性状や外観が変性することが知られている。これに対して加熱処理を伴わない、非加熱処理については化学的処理と物理的処理技術があり、代表的な技術として放射線照射、高電圧パルス、パルス光、高圧処理等が知られている。そのなかでも静水圧を利用した高圧処理は、1980年代に日本において林氏が約100 MPa以上の圧力を食品加工に利用する事を提唱して以来、高圧におけるさまざまな研究や高圧処理食品が開発されるようになった。高圧加工は加熱処理を施さないために、加熱による変性が少なく、果物等においては比較的生の食材の香り、色、風味が保たれた状態での食品製造が可能である。また、高圧処理により微生物が死滅するので、高圧力による食品汚染微生物の低減も可能である。

生の肝臓は病原菌に汚染している可能性が高いことから、生食するためにはこれらの病原菌、特に腸管出血性大腸菌の殺菌処理が必要となってくる。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必要がある。本研究では、非加熱殺菌処理の一つとして高圧処理による肝臓中の *E. coli* の不活化効果の検討を行った。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、1250MPa180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。

また、日本国内では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がしばしば起こっている。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。また、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おり、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。本研究では、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

牛肝臓への接種試験には、*Escherichia coli* ATCC25922を用いた。培養菌液に対する高圧処理実験には、*S. Typhimurium*、*Salmonella* Enteritidis、*Pseudomonas aeruginosa*、*Cronobacter sakazakii*、*Providencia alcalifaciens*、*Yersinia enterocolitica*の計7菌株を用いた。鶏ササミへの接種試験には、*Salmonella* Typhimurium LT2株と*Campylobacter jejuni* NCTC 11168株を用いた。

##### (2) 検体

高圧処理を行う牛の肝臓は株式会社芝浦臓器より購入した。2代継代した *E. coli*  $10^8$  CFU/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  $\mu$ l 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。

培養菌液に対する高圧処理の検討は、培養した菌液をリン酸緩衝液に懸濁し、 $10^8$ CFU/mL となるように調整してアンプルに充填したものをを用いた。

鶏ささみ肉検体は市販のものをを用いた。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

牛肝臓及び培養菌液に対する高圧処理試験には、HPV-80C20-S(スギノマシン)を用いた。高圧処理条件は、平成25年度には200、300、400及び500MPaの圧力で、それぞれ10、20及び30分間、平成26年度には250MPaの圧力で、60分、120分、180分間とした。

鶏ササミに対する高圧処理試験にはTSF6-50(東洋高圧)を用い、300MPa、5分を6回反復する条件で行った。

### (4) 菌数測定

牛肝臓に対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を9倍量の希釈水中で10倍乳剤を作成し、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。

培養菌液に対する高圧処理の検討は、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℃或いは各菌の指摘温度で24時間培養し、発育した集落を計測した。

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ッカー処理して5倍乳剤を作成し、各100  $\mu$ LをBHI寒天平板及びCHROMagarサルモネラ平板に塗布後、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、CHROMagarサルモネラ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

高圧処理後の肝臓肉色の変化を色差計(ミノ

ルタ)で測定した。肉質の硬さはレオメーターCR-3000EX(サン科学)を用いて測定した。

高圧処理による鶏ササミ肉の硬度及び色調の変化は、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

100~500MPaで処理した肝臓検体及び300MPaで処理した鶏ササミ検体を10%緩衝ホルマリン液で37℃一夜固定したのち、薄切して再度10%緩衝ホルマリン液にて固定した。パラフィン包埋後、切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。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、光学顕微鏡を用いて観察した。

牛肝臓については、同条件での高圧処理後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超微細形態の観察を行った。

### C. 結果

#### (1) *E. coli* の高圧処理による不活化効果

リン酸緩衝液に懸濁した*E. coli*の高圧処理における結果を平成25年度分担報告書Fig.1に示した。高圧処理前の未処理での菌数は対数値で9 log CFU/mlであった。これらの菌液の高圧処理を行うと、高圧処理200MPa・10分処理では未処理とほぼ同様の菌数を示し、高圧処理による菌数の減少は認められなかった。さらに高圧処理の時間を延長した20分処理では、死滅する現象が観察され、30分処理で1オ・ダの減少が認められた。次に高圧処理300MPaでは、200MPaに比べて急激な菌数の減少が観察され、10分処理で4.4 log CFU/ml、20分処理で3.3 log CFU/ml、30分処理で2.9 log CFU/mlに減少した。さらに高圧処理400MPaでは10分処理で3.0 log

CFU/ml、20分処理で2.6 log CFU/ml、30分処理で2.9 log CFU/mlに減少した。最も圧力の高い500MPaでは、10分処理で1.9 log CFU/ml、20分処理と30分処理では検出限界以下であった。

以上の結果、高圧処理により5 log CFU/mlの有効な低減効果が認められた圧力は400MPaと500MPaであった。さらに高圧処理時間を延長するにつれて、緩やかではあるものの殺菌効果が高まる傾向が認められた。

#### (2) 高圧処理による肝臓中の*E. coli*の不活化効果とその外観に及ぼす影響

牛肝臓に接種した*E. coli*の高圧処理による不活化効果を非選択培地のPCA培地を用いて生残菌数の結果を平成25年度分担報告書Fig.2に示した。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、牛の肝臓に*E. coli*を接種して高圧処理条件を200MPa、300MPa、400MPa、500MPaそして処理時間10分で行った。その結果、肝臓中の未処理菌数は7.1 log CFU/gを示した。200MPa処理ではほとんど菌数の減少が観察されなかった。300MPaから菌数の減少が観察され1.5 log CFU/gの減少が認められた。さらに400MPaでは3.0 log CFU/gの減少、最も高い圧力の500MPaでは5 log CFU/gの菌数減少が認められ、5D程度の殺菌効果が得られた。実際に有効な5D程度の殺菌効果が認められた圧力は500MPaのみであった。

次に、同様に処理した試料を大腸菌の選択培地であるXMG培地を用いて検出測定した結果を平成25年度分担報告書Fig.3に示した。未処理の接種菌数はやや非選択培地より少ない6.8 log CFU/gであった。高圧処理200MPaでは菌数の減少は認められなかった。300MPa以上の圧力から菌数の減少が観察され、300MPaでは1.8 log CFU/gの減少が認められ、400MPaでは3.1 log CFU/g減少した結果となった。さらに

500MPa では 5.0 log CFU/g と有効な菌数の減少が認められ、5D 程度の殺菌効果が得られた。検出培地である非選択培地の PCA 培地と選択培地の XMG 培地間には顕著な差は観察されなかった。

以上のことから、非選択培地と選択培地による検出結果には、両者の測定法に差がないことから、選択培地に使用される選択剤による損傷菌による影響は少ないものと推察された。

高圧処理による肝臓色の变化を測定した結果を平成 25 年度分担報告書 Table1 に示した。肝臓の外観は圧力が高まるにつれて肝臓の色彩は、赤みが減少し肌色に変化する傾向が認められた。色彩色差計では、未処理の肝臓数値は L 値が  $36.7 \pm 1.3$ 、a 値が  $6.5 \pm 0.6$ 、b 値が  $2.2 \pm 0.3$  を示した。圧力が高くなるにつれて、L 値は 200MPa より数値が増加し、300MPa で  $44.3 \pm 1.1$ 、500MPa で  $50.4 \pm 0.4$  に増加した。a 値では 300MPa に  $10.1 \pm 1.0$  に数値の増加が認められたものの 400MPa と 500MPa では顕著な変化は認められなかった。さらに b 値では 300MPa まで大きな数値の変動は見られなかったものの、500MPa では  $8.0 \pm 0.6$  にまで増加した。

次に高圧処理における肝臓の色と硬さの変化を平成 25 年度分担報告書 Table 2 と Fig.4 に示した。肉色は処理前では鮮明な赤褐色を示したものの、高圧処理 200MPa では赤みが少なくなるものの肝臓色を維持していたが、300MPa 以降、400MPa と 500MPa と圧力が高くなるにつれて、赤みが退色し、白っぽくなり加熱したような色合いとなった。硬さについては、300MPa 以上で、当初の肝臓の柔らかさではなく、明らかに硬さが認められ、400MPa と 500MPa では弾力も感じられるようになった。特に未処理の肝臓とは肉質がかなり異なっていた。

以上の結果から、*E.coli* に対する効果は

500MPa・10min 処理で、5D の殺菌効果が得られ、有効な不活化効果が認められた。しかし、肝臓の状態は生の状態の色彩とテクスチャーは失われ、別物の感触となった。

(3) 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 分の結果を平成 26 年度分担報告書 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 3D 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 5D 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、3D 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 5D 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。

#### (4) 高圧処理における食品媒介病原細菌の死滅効果の検討

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平成 26 年度分担報告書 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 - ダ - 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。

#### (5) 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平成 26 年度分担報告書

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 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 - 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。

#### (6) 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平成 26 年度分担報告書 Table 1 に、写真を平成 26 年度分担報告書 Fig. 5 に示した。未処理の肝臓の肉色は L 値が  $34.14 \pm 0.93$ 、a 値が  $9.50 \pm 0.23$ 、b 値が  $4.43 \pm 0.50$  であった。250MPa の圧力処理を行うと 60 分処理で L 値が  $41.74 \pm 0.48$ 、a 値が  $16.17 \pm 0.51$ 、b 値が  $7.04 \pm 0.79$  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  $43.33 \pm 1.17$ 、a 値が  $15.71 \pm 0.93$ 、b 値が  $7.18 \pm 1.26$  となった。さらに 180 分処理では L 値が  $45.68 \pm 0.95$ 、a 値が  $14.29 \pm 0.38$ 、b 値が  $7.21 \pm 0.62$  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平成 26 年度分担報告書 Table 2 に、平成 26 年度

分担報告書写真を 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。

平成26年度分担報告書 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。

#### (7) 高圧処理による牛肝臓の形態学的変化

高圧処理後の牛肝臓の外見写真を平成25年分担報告書 Fig.1 に、剖面写真を Fig.2 に示す。高圧処理により、牛肝臓検体の体積は外見的にはほとんど変化がなかった。肝臓の色は高い圧で処理した検体ほど、暗赤褐色から淡褐色へと退色が顕著であった。牛肝臓の剖面を作る際にナイフで切った際の感触では、より高圧で処理した検体ほど弾力が強く、硬くなっている傾向が認められた。Fig.2の剖面写真においても、高圧で処理した検体の断片ほど、断片が崩れることなく、硬くなっている様子が示されている。また、0MPaでは暗赤褐色で一様な断面を示しているが、200MPaではやや色合いが薄くなり、300、400、500MPaでは断面が淡赤褐色～淡褐色の斑状を呈していた。

形態学的には、高圧処理をした肝臓においても、肝細胞の索状配列や小葉構造などに形態的な変化はほとんど認められなかった(平成25年分担報告書 Fig.3)。しかし、強拡大像では、肝細胞の細胞質内に好酸性の小顆粒が認められるようになる一方、肝細胞細胞質の染色性は全体的に低下しており、また、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(平成25年分担報告書 Fig.4)。

#### (8) 高圧処理による牛肝臓の超微細形態学的変化

高圧処理後の牛肝臓の電子顕微鏡写真を平成27年度分担報告書 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)。

#### (9) 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平成27年度分担報告書図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  $1.04 \times 10^8 \text{ CFU/g}$  及び約  $7.2 \times 10^7 \text{ CFU/g}$  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  $8.5 \times 10^2 \text{ CFU/g}$ 、2回目が  $1.05 \times 10^6 \text{ CFU/g}$ 、3回目が  $9 \times 10^2 \text{ CFU/g}$  であった(平成27年度分担報告書図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(平成27年度分担報告書図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。

(10)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(平成27年度分担報告書表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(平成27年度分担報告書表2)。

300MPa、5分の高圧処理による鶏ササミの組織学的変化を平成27年度分担報告書図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(平成27年度分担報告書図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(平成27年度分担報告書図5)。

#### D. 考察

400及び500MPaの高圧処理により、肝臓中の*E. coli*に対する不活化効果は認められるものの、その品質がかなり変性することが観察された。これらの処理を行った牛肝臓では、色が白っぽくなり、硬くなるなどの明らかな変化が認められた。しかし、組織形態学的にはそのような変化と一致するような著しい変化は観察されなかった。外見的な肝臓の色の変化は、肝細胞細胞質の染色性の低下と関連している可能性が考えられる。しかし、肝細胞の索状配列や肝臓の小葉構造などにほとんど変化はなく、また、肝細胞の大きさにもほとんど違いが認められないことから、少なくとも、高圧処理により肝臓が硬くなることに関して、形態学的変化と関連付けて説明することはできなかった。

300MPa以上の高圧処理検体で認められた肝細胞の細胞質内の好酸性小顆粒や血管内の好酸性顆粒状構造物については、光学顕微鏡レベルでの観察では不十分であり、より詳しく調べるためには電子顕微鏡を用いた微細形態学的検討をじっしした。その結果、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。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と考えられた。

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、2D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值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、未処理の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、未処理肝臓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。

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る。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。

#### E. 結論

非加熱殺菌処理方法の一つである高圧処理による肝臓中の *E. coli* の不活化効果の検討を行った結果、500MPa、10 分の処理で、5D の殺菌効果が認められた。しかしながら、高圧処理により肝臓の赤みが退色し、白っぽくなり加熱したような色調変化と、著しい硬化がみられ、品質が大きく変化していた。品質変化を防ぎ、十分な殺菌効果を示す条件の検討が必要であることが示された。

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ところ、高圧処理により生じる牛肝臓の色、ならびに硬さの著しい変化に対応するような、顕著な形態学的所見は得られなかった。組織構造に大きな変化は認められなかったが、細胞レベルでの微細な変化は認められた。電子顕微鏡を用いた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。

高圧処理の 250MPa、180 分処理は、希釈液中の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。しかしながら、低減菌数は 2log にとどまった。

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 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



研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文・総説

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
等々力節子, 川崎晋	放射線殺菌	食品衛生学雑誌	55	J215-218	2014

学会・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	牛肝臓中における腸管出血性大腸菌のガンマ線照射による殺菌効果	日本食品衛生学会第106回学術講演会	H25/11/21,22
等々力 節子, 都築 和香子, 亀谷 宏美, 齋藤 希巳江, 川崎 晋, 五十君 静信	牛肝臓のガンマ線照射による品質変化	日本食品衛生学会第106回学術講演会	H25/11/21,22
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
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