

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

畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究

平成 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 由美子

平成 30 (2018) 3 月

畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究

研究代表者 岡田 由美子

平成 30 (2018) 年 3 月

目次

・ 総括研究報告

畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究

岡田 由美子

----- 1

・ 分担研究報告

1. 牛肝臓等における細菌汚染実態に関する研究

朝倉 宏 他

----- 21

2. 牛肝臓の冷蔵保管中の温度変化と牛胆汁の細菌動態に関する研究

佐々木 貴正 他

----- 41

3. 放射線照射による微生物除去

等々力 節子 他

----- 47

4. 高圧処理による牛肝臓中の食中毒原因菌の不活化に関する検討

岡田 由美子 他

----- 57

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 65

平成 29 年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

佐々木 貴正 国立医薬品食品衛生研究所

等々力 節子 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究部門

研究協力者

山本 詩織 国立医薬品食品衛生研究所

方波見佐知子 青森県十和田食肉衛生検査所

大窪 富士子 岩手県食肉衛生検査所

相馬 要 千葉市東総食肉衛生検査所

白木 豊 岐阜県食肉衛生検査所

西部 尚史 岐阜市食肉衛生検査所

久本 千絵 兵庫県食肉衛生検査センター

尾島 康世 高知市食肉衛生検査所

清島 綾子 福岡県食肉衛生検査所

川瀬 遵 島根県食肉衛生検査所

城間 健 鹿児島県阿久根食肉衛生検査所

川崎 晋 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究部門

清藤 一 国立研究開発法人 量研機構 高崎量子応用研究所

鈴木 穂高 茨城大学

百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所

(敬称略、順不同)

平成 29 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究
(H28-食品-一般-005)

総括研究報告書

研究代表者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

日本国内では近年、食文化の多様化による畜産食品の生食が見られるようになり、それに伴って微生物や寄生虫による健康被害が報告されている。その結果、生食用牛肉の加工基準の設定、牛肝臓、豚肉等の生食用提供の禁止等の行政措置が取られてきた。一方で生食用の牛肝臓を安全に提供する技術を望む声も聞かれる。本研究では、牛肝臓における微生物汚染実態を明らかにすると共に、汚染拡大を低減しうる管理手法の検討並びに汚染細菌を低減させる非加熱殺菌法の検討を行った。

平成 29 年 6 月～9 月及び同年 12 月～30 年 2 月に、計 10 自治体の食肉センターでとさつ・解体された計 93 頭分の検体について、牛肝臓表面、胆嚢内胆汁、肝実質（右葉、左葉各 2 部位）の計 6 部位を対象とした衛生指標菌の定量試験を行ったところ、計 76 頭分（81.7%）の肝実質検体は腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の全てに陰性を示した。また、腸内細菌科菌群が検出されたものは計 14 頭分（15.1%）であった。昨年度、試験開始迄に約 3 時間の輸送時間を要した自治体では本年度は採材直後に試験を行い、8 頭分のうち、7 頭分の肝実質で糞便汚染指標菌が陰性となったこと、胆嚢を結紮・除去せずに一夜かけて冷蔵輸送を行った後の肝実質中の腸内細菌科菌群数は概ね 10^4 オーダーとなった状況等から、採材後速やかな牛肝実質を加工に供することが細菌汚染低減に資する対策の一つと目された。肝実質より腸内細菌科菌群が検出された計 14 頭（最大菌数 4.3×10^4 CFU/g）の肝臓等検体のうち、胆汁で同菌陽性を示した個体の肝実質では同菌の広範囲に亘る汚染が認められたことから、胆汁検査により、高い糞便汚染指標菌汚染分布を示す牛肝臓を排除できる可能性が示唆された。また、摘出後の肝臓内部の細菌汚染実態及び保管・流通段階における細菌挙動を解明し、リスクに応じたリスク管理措置を明らかにする目的で、摘出直後の肝臓の表面及び内部に温度ロガーを取り付け、出荷までの温度変化を計測した。肝臓丸ごとでは、5 まで低下するのに 20 時間を要したが、10 cm 角にカットした場合には 5 時間で 5 まで低下した。また、サルモネラについて胆汁中での増殖可能性を検討したところ、38 においてミュラー・ヒントン培地と同程度に増殖した。以上のことから、肝臓摘出後に肝臓丸ごとで保管・流通する場合には、例え、低温かつ低濃度の細菌汚染であっても、肝臓内部の細菌汚染は速やかに拡大すると考えられた。

非加熱殺菌法の検討は、放射線照射と高圧処理を検討した。放射線照射の検討では、牛肝臓に $10^5 \sim 10^7$ CFU/g の *Escherichia coli* O157 DT66 株もしくは *Salmonella* Enteritidis

IFO3313 株を接種し、4.0～8.1、8.0～12.3 kGy の範囲のガンマ線を照射した場合での生残試験を行った。昨年度までの研究で得た生残曲線に予測信頼区間を設け、その予測信頼区間上限の結果から、*E. coli* O157 の場合は、5.3～5.5 kGy、*S. Enteritidis* の場合 8.2～8.5 kGy の照射により 95% から 99% の信頼度で 10^5 CFU/g を低減させることが可能であると考えられ、ガンマ線による照射試験の結果はその予測を反映していた。高圧処理の検討では、高圧処理時の温度が食中毒菌の低減に与える効果と、牛肝臓の肉質変化に与える影響を検討した。高圧処理時の温度を 25、37 及び 42 に設定し、300MPa 5 分間を 3 回反復する高圧処理を行ったところ、サルモネラ属菌は 25 で 1.5～2.1 log、37 で 3.2～3.6 log、42 で 5.2～6.4 log の低減を示した。リステリアモノサイトゲネスでは、25 で 6.0～6.6 log、37 で 7.0～7.7 log、の低減を示し、42 では定量法の検出限界以下となったものの、増菌培養により菌が検出され、完全な死滅とはならなかった。牛肝臓の肉質変化に与える影響の検討では、高圧処理単独では硬さの変化は見られず、高圧処理の有無に関わらず、37 及び 42 の加温で柔らかくなる傾向が見られた。色調変化は加温のみではほとんど見られなかったが、高圧処理により白化と共に黄色みが増加する傾向が見られた。以上の結果から、牛肝臓中の高圧処理を行う際に加温条件下で行うことで、食中毒菌の菌数低減効果を大幅に高めることが可能であることが示された。一方で、今回実施した条件では肝臓の色調変化が強く、その抑制が今後の課題となった。

来年度は上記の知見を踏まえ、胆汁検査の有用性ならびに製造（加工）基準として採材工程を含める意義を検証するため、代表的なとちく場で通常検査ならびに処理工程を経て出荷直前にある牛肝臓を対象に実質等での細菌汚染実態を調査し、同施設環境及び工程を通じた衛生管理対策の確保に資する知見を創出する。放射線照射の検討では、自然汚染試料についての殺菌効果の確認を行うとともに、流通を念頭においた試料の形体における商業照射施設での照射における線量分布の検証を行う。高圧処理においては、高圧処理の反復回数を減少させる、加温温度を 30～32 にとどめる等、今年度得られた殺菌効果を保持しつつ色調変化を抑制する条件の検討を行う予定である。

分担研究者：

朝倉宏 国立医薬品食品衛生研究所

佐々木貴正 国立医薬品食品衛生研究所

等々力節子 国立研究開発法人 農研機構
食品総合研究部門

研究協力者：

山本詩織 国立医薬品食品衛生研究所

方波見佐知子 青森県十和田食肉衛生検査
所

藤森 亜紀子 岩手県食肉衛生検査所

相馬要 千葉県東総食肉衛生検査所

白木豊 岐阜県食肉衛生検査所

西部尚史 岐阜市食肉衛生検査所

久本千絵 兵庫県食肉衛生検査センター

尾島康世 高知市食肉衛生検査所

清島綾子 福岡県食肉衛生検査所

川瀬遵 島根県食肉衛生検査所

城間健 鹿児島県阿久根食肉衛生検査所

品川邦汎 岩手大学

川崎晋 国立研究開発法人 農研機構 食品
総合研究部門

清藤一 国立研究開発法人 量研機構 高崎
量子応用研究所

鈴木穂高 茨城大学

百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

現在わが国では、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による集団食中毒事例をきっかけとして、生食用牛肉の加工基準の設定及び牛肝臓の生食禁止という行政措置が行われている。一方、牛肝臓の生食の安全性を確保した上で、規制の解除の要望も出されている。本研究では、日本国内における牛肝臓中の腸内細菌科菌群等の

汚染実態調査やその最大値を把握することを目的として、全国の食肉処理施設の協力を得て、汚染実態とその季節変動、と畜解体処理手法等に関する調査解析を行った。また、摘出後の肝臓内部の細菌汚染実態及び保管・流通段階における細菌挙動を解明し、リスクに応じたリスク管理措置を明らかにする目的で、摘出直後の肝臓の表面及び内部の温度変化を調べた。更に、畜産食品を汚染する食中毒菌を生食可能なレベルまで低減することを目的として、放射線照射及び高圧殺菌について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 汚染実態調査

10 自治体 (A~J) の協力を得て、以下の試験を実施した。

1. 牛肝臓検体の条件等

検体は、以下の条件を満たすものとした。

(i) 採材対象とする牛個体は、概ね 36 ヶ月齢以下の未経産雌または去勢雄の交雑種または黒毛・褐毛和種であること。

(ii) 当該個体は、自治体管内あるいは隣接管内で生産され、とちく当日あるいは前日に輸送されたものであること。

(ii) 生体検査において異常を認めない個体であること。

(iii) 内臓検査において異常を認めず、被膜の大きな損傷がないこと。

(iv) 胆嚢に損傷がなく、胆汁が十分に満たされていること(肉眼的に胆汁の漏出がないことが望ましい)。

肝臓の採材にあたっては、食肉センターでとちくされた、牛と体より、腹側正中線を切開した後、胆嚢を保持した肝臓を可能な範囲で衛生的に取り出し、胆嚢と総胆管の間を外側

から絹糸等で縛り、胆汁の漏出を制御するように努めた。その後、速やかに10度以下の温度帯で検査室に搬送し、次項の手順に従って、部位毎の採材を行った。各施設での採材手順、搬入条件(温度、時間)等についてはその都度記録した。

2. 検体調整等

搬送された牛肝臓については、以下の手順で可能な限り無菌的に部位別に切り分け、検体とした(分担報告書 図1~5)。

1) 採材方法等について

検体入手後は、速やかに胆嚢管を結紮し、胆汁の漏出防止に努めた。以後の作業に着手する迄の間は、10℃以下で冷蔵保存を行い、個体識別番号を記録した。複数検体を同日に処理する場合には、1頭分ごとにビニール袋に入れる等して、交差汚染の防止に努めた。

2) 採材部位及び前処理

肝臓左葉表面1ヶ所(検体部位番号1)、胆汁(検体部位番号2)、実質左葉2箇所(検体部位番号3,4)、実質右葉2箇所(検体部位番号5,6)の計6部位を無菌的に採材した。以下に各部位の採材方法を述べる。

表面拭き取り(検体部位番号1)

肝臓全体が載る大きさのバットやまな板等にラップ等を敷き、肝臓・胆嚢検体を分担報告書 図1のように配置した。左葉中心部に10cm x 10cmの拭き取り枠をあて、拭き取り検査キットを用いて、指示書に従って拭き取り操作を行った。採取検体は試験に供する迄、10℃以下又は氷上で保存・輸送した。検体を試験に供するまでの時間は概ね3時

間以内とした。表面拭き取りについては、肝臓摘出直後に実施することも可とした。

胆汁(検体部位番号2)

19.5 Gの滅菌済注射針と10 mL容の滅菌済ディスプレイ注射筒を用い、予め表面を70%エタノールで消毒した胆嚢表面に穿刺して10 mL以上の胆汁を回収した(分担報告書 図2)。回収した胆汁は15 mLの滅菌遠心管へ移し替え、10℃以下または氷上で保存し、概ね3時間以内に試験に供することとした。

肝臓実質(検体部位番号3~6)

消毒済の刃物を用いて左葉を切り離し、左葉中央部を切り出した後、切り出した左葉外側(検体番号3)及び左葉内側(検体番号4)を切り出し、それぞれ滅菌シャーレに取り分けた(分担報告書 図3)。その後、上下反転させ、右葉を切り離した。左葉と同様に右葉中央部を切り分け、右葉内側(検体番号5)及び右葉外側(検体番号6)を切り出し、滅菌シャーレに取り分けた。切り出すブロックの大きさの目安としては、少なくとも各辺5cm以上とした。

滅菌済ディスプレイタイプのメス及びピンセットを用いて、検体番号3~6の表面(シャーレに接する底面以外の5面)から1 cmを目安に切り出した(分担報告書 図5)。この際、滅菌済メス及びピンセットは1面切ると共に、70%エタノール及び滅菌水による消毒洗浄を行った。その後、底面より1cm上部を切り取り、新しい滅菌シャーレに移した。同ブロックの重量を計測しながら、10gとなるよう調整し、滅菌ストマッカー袋に40 mLの緩衝ペプトン水と共に加えた。1

分間ストマッキング処理を行い、検体懸濁原液を調整した。

3. 衛生指標菌の定量試験

衛生指標菌の定量にあたっては、9mL 容の滅菌 PBS を用いて各検体の 10 倍階段希釈列を作成した。その後、各 1mL の試験溶液を、3 種類のペトリフィルム (RAC プレート、EB プレート、EC プレート)(3M) に接種し、指示書に従って培養・計数を行うことで、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数を求めた。

4. DNA 抽出

上記 2. で調整した検体懸濁溶液 0.5mL より、Cica Genious Total DNA prep kit (関東化学) を用いて、DNA 抽出を行った。

5. STEC 及びサルモネラ属菌の定性試験

上記 2. で調整した懸濁溶液残液を 37 にて 18 時間培養後、培養液 1mL を 1.5mL 容エペンドルフチューブに分注した。16,000 x g 以上で 5 分間遠心後、上清を取り除き、沈渣に 100 μ l 滅菌蒸留水を加えて、95 にて 5 分間加熱し、DNA 抽出液を作成した。これを鋳型として、サルモネラ属菌及び STEC の *stn* 遺伝子及び *stx* 遺伝子を PCR 法により検出した。

6. 胆嚢を結紮・除去せずに、チルド輸送した牛肝臓の細菌汚染実態調査

自治体 C で衛生的に採材した牛肝臓検体を、胆嚢を結紮・除去せずに、当所まで一夜かけてチルド輸送し、肝臓実質及び胆汁の細菌汚染実態について、上項 2~5 に準じて評価した。

(2) 牛肝臓の冷蔵保管中の温度変化と牛胆汁の細菌動態

1. 材料 (肝臓及び胆汁)

1 と畜場でと殺・解体された黒毛和種又は交雑種の肝臓及び胆嚢内胆汁を用いた。当該と畜場では、肝臓摘出後、と畜検査員によると畜検査後に、フックに掛けられ、内臓取扱業者の加工室に運ばれる。そこで、洗浄されたステンレス製作業台に置かれ、胆嚢切除後に次亜塩素酸水で表面を洗浄後、ビニール袋に入れられ、氷水中に約 10 分間浸漬される。その後、プラスチック製のトレイに他の臓器 (心臓、尾、舌などの赤物と呼ばれる臓器) ともに入れられ、冷蔵室 (設定値 4) で翌日まで保管される。その後、翌日午前加工販売業者に運ばれる。胆汁の採取については、肝臓から切除された胆嚢を作業員から受け取り、その場で、19G 注射針を取り付けた 50mL シリンジを用いて胆汁を約 50mL 採取した。なお、注射針を突刺する部位はアルコール綿で予め消毒した。採取した胆汁は保冷剤を入れたクーラーボックスに入れて輸送し、3 時間以内に試験に供した。

2. 肝臓の表面及び内部の温度変化

上述のビニール袋に肝臓を入れる際に、左葉の中央の表面 (漿膜下) 及び深さ 4 cm の部分に温度ロガーを取り付け、翌日の出荷までの間の温度を経時的に計測した (丸ごとの場合)。また、出荷時の肝臓を当研究所に持ち帰り、10cm 角の大きさに切断し、ウォーターバスで 39 まで温めたのち、深さ 4 cm の部分に同様に温度ロガーを取り付けて温度変化を計測した。

3. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群濃度
胆汁を、PBS を用いて 10 倍段階希釈し、3 M 社製のペトリフィルム (EB プレート) を、各濃度 2 枚を用いて計測した。

4. 胆汁中におけるサルモネラ増殖

採取した各胆汁 100 μ L について、ミュラー・ヒントン寒天培地、GAM 培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ C で好気培養及び嫌気培養、さらに、各 100 μ L を mCCDA 培地に塗抹し、30 $^{\circ}$ C 及び 42 $^{\circ}$ C で微好気培養を行い、すべての培地で菌の発育が認められなかった胆汁を使用した。これら胆汁に、ミュラー・ヒントン寒天培地又はミュラー・ヒントン液体培地で 1 夜培養 (37 $^{\circ}$ C) したサルモネラ株 (LT2 株) を終濃度約 2~3 log cfu/mL となるよう胆汁に懸濁し、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 及び 38 $^{\circ}$ C で 5 時間まで培養した。なお、対照としてミュラー・ヒントン液体培地でも培養した (38 $^{\circ}$ C のみ)。

(3) 放射線照射

1. 材料

微生物試験用の牛肝臓試料は、屠殺直後に凍結した牛肝臓塊 (約 5.3 kg) を用いた。これらは購入後、-80 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。

2. 供試菌株

供試菌は、*E. coli* O157 DT66 株ならびに *S. Enteritidis* IFO3313 株を用いた。供試菌を Trypticase Soy Broth (TSB; Difco) にて 35 $^{\circ}$ C 一昼夜静置培養した後、遠心分離 (4000 x g, 10 分間) により菌体を収集、培

地成分を除去した。おのおの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、10⁹ CFU/mL となるように調整、これを供試菌液として以降の試験に用いた。

3. ガンマ線照射と線量分布確認

ガンマ線照射は、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構、高崎量子応用研究所 (量研、高崎研) のガンマ線照射施設を用いて行った。照射時の温度は、冷凍 (ドライアイス下: -80 $^{\circ}$ C) とし、照射中の温度を一定に保つため、肝臓試料の背面にドライアイス を当て、全体を発泡スチロールの容器に入れ、前面から照射を行った。照射時間の半分で肝臓試料を裏返し、両面照射を行った。線量率は約 2.5 kGy/h であった。

毎時の吸収線量の確認は、照射試料の外箱の基準位置にアラニン線量計 (アミノグレイ、日立電線株式会社) を取り付け、量研、高崎研が校正した検量線を用いた線量測定システムにより行った。このシステムにおける線量測定の不確かさは 3% である。

吸収線量の分布は、殺菌試験に用いたものと同型の肝臓試料を模擬試料とし、試料内部と表面に装着したアラニンペレット (ES200-2106: プルッカーバイオスピン社製) とともに、常温照射を行った。照射後アラニンペレットの信号を ESR 装置 (Bruker EMX-Plus) で測定して決定した。検量線は英国の National Physical Laboratory の標準アラニンペレットで作成した。

4. 牛肝臓のガンマ線殺菌効果確認試験

菌体の接種は、自然解凍後した 25 g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液 100 μ L を注射針により注入することで行っ

た。菌体濃度は終濃度で、 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g 程度となるように調製した。菌体接種後の試料は、直ちに、ガスバリア袋 (PTS 袋; 三菱ガス化学製、PB180250P 90×120mm) を用いて脱気包装を行った。包装後の検体は、 -80 の冷凍庫内で 2 時間以上放置して温度を一定にした後、ガンマ線照射(目標線量 4 ~ 12 kGy)で照射した。

5. 標的微生物の検出

ガンマ線照射後の検体に滅菌緩衝ペプトン水を加えて 10 倍乳剤とした後、 35 で一昼夜培養した。培養した菌液は標準寒天平板および VRBG 平板 (Oxoid) に一白金耳を各線し、 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 *E. coli* O157 および *Salmonella* 同定キット (Singlepath *E. coli* O157; Merck Singlepath *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *E. coli* O157 もしくは *Salmonella* 属であることを確認した。

(4) 高圧処理の検討

1. 供試菌株

Salmonella enterica は昨年度した 3 菌株で最も高圧耐性の高かった JCM1652 株を用いた。*Listeria monocytogenes* は ATCC19115 株 (血清型 4b) を用いた。菌株は -80 に保存し、Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地に植え、単一集落を BHI 液体培地に接種して 37 で 20-24 時間静置培養したものを高圧処理試験に供した。

2. 検体

菌液を用いた殺菌効果の高圧処理試験では、(1) の培養菌液を高圧処理用袋に分注

後、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。肉質変化の検討に用いる牛肝臓は、購入後、冷蔵状態で運搬した。肝臓検体は 20 g に切断し、高圧処理前の硬度、色調を計測後、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

菌液を用いた高圧処理試験では、二重包装済みの菌液検体を、Dr. CHEF (神戸製鋼株式会社) を用いて 300 MPa での高圧処理を 3 回反復する条件で行った。処理温度は、設定圧力到達時の温度が 25 から 42 となるように設定した。牛肝臓を用いた試験でも、検体を二重包装し、菌液と同様の条件を用いた。

4. 加温処理

牛肝臓における (3) の対照群として、常圧で温度のみ上昇させた場合の肉質変化の検討を行った。高圧処理用袋に密封した肝臓検体を 37 又は 42 に設定した恒温水槽に沈め、高圧処理に要する時間と同じ時間、加温処理を行った。

5. 菌数測定

菌液を用いた高圧処理試験では、高圧処理後の包装を無菌的に開封し、菌液を滅菌生理食塩水中で 10 倍階段希釈して、各希釈列の各 $100\mu\text{l}$ をサルモネラ属菌では TS 寒天平板及び CHROMagar サルモネラ平板に、リステリアでは BHI 寒天平板及び CHROMagarListeria 寒天平板に塗布後、 25 で好気培養を行い、24 及び 48 時間後に定型集落の計数を行った。

6. 硬度及び色調

高圧処理前、高圧処理後及び加温処理後の肝臓検体について、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。

C. 結果

(1) 汚染実態調査

10自治体(A~J)の協力を得て、各食肉センターでとちく解体された計98頭の牛肝臓検体を採取した。これらのうち、5頭分の肝臓については、採材後に行われた、と畜精密検査により、胆管炎や膿瘍が認められたことから、異常検体として整理を行い、健常検体対象からは除外した。

1. STEC 及びサルモネラ属菌の検出状況

PCR スクリーニング試験の結果として、全ての供試検体(98頭×6部位=306検体)は、陰性を示した。

2. 衛生指標菌の検出状況

1) 部位別成績比較(分担報告書 表1及び2)

(i) 一般細菌

表面拭き取り検体では、計93頭分の牛肝臓表面における拭取り成績として、82検体で陽性を示し(陽性率88.2%)、陰性検体も含めた全体の平均値は 2.9×10^3 CFU/100cm²(最小値:検出限界以下、最大値: 1.2×10^5 CFU/100cm²)であった。

胆汁検体については、計13体が陽性を示し(陽性率12.9%)、最大値は 4.1×10^6 CFU/mLであった。

実質左葉・右葉検体では、それぞれ29検体(陽性率31.2%)および31検体(同33.3%)が陽性を示し、実質全体での最大値は、 1.7×10^7 CFU/g、陰性検体も含めた全体の平均値は 3.6×10^2 CFU/gであった。

(ii) 腸内細菌科菌群

表面拭き取り検体のうち、38検体では腸内細菌科菌群が検出され(40.9%)、最大値は 2.5×10^5 CFU/100cm²であった。

胆汁検体については、6検体が陽性となった(陽性率6.5%)が、最大値は 1.2×10^3 CFU/mLに留まった。

実質左葉・右葉検体では、9検体および11検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 4.3×10^4 CFU/gであった。

(iii) 大腸菌群

表面拭き取り検体では、31検体から大腸菌群が検出され(33.3%)、最大値は 1.2×10^4 CFU/100cm²であった。

胆汁検体では、4検体が陽性となり(陽性率4.3%)、最大値は 3.2×10^5 CFU/mLと腸内細菌科菌群よりも高値を示した。

実質左葉・右葉検体では、6検体および10検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 3.2×10^2 CFU/gであった。

(iv) 大腸菌

大腸菌陽性を示した表面拭き取り検体は計21体あり、最大値は 1.8×10^2 CFU/100cm²であった。胆汁検体は3検体が陽性となった。

実質左葉・右葉検体では4検体および2検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 3.6×10^3 CFU/gであった。

2) 施設別の成績比較 (分担報告書 表 2 及び図 6-15)

(i) 自治体 A

夏季 5 検体、冬季 5 検体の検討を行った。同施設での採材から試験開始までの所要時間は 1 時間 30 分～2 時間 25 分であり、清浄なプラスチックコンテナを用いて採材し、表面拭取りならびに外科用糸を用いた胆嚢根部の結紮を行った後、大量の氷を入れた発泡スチロール箱内で庫内温度として 10℃以下を保ちつつ搬送された。当該施設での牛肝臓検査合格率は約 69%、所属自治体管内あるいは隣接管内からの生体搬入率は約 8～9割であった。

計 10 検体は表面を除く、胆汁・実質部位において、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が陰性を示した。肝臓表面の一般細菌数は夏季の平均値が $2.4 \times 10^3 \text{CFU}/100 \text{ cm}^2$ 、冬季が $2.1 \times 10^2 \text{CFU}/100 \text{ cm}^2$ であった。腸内細菌科菌群陽性数も夏季が 3 検体であったのに対し、冬季は 1 検体のみにとどまっていた。

(ii) 自治体 B

夏季及び冬季でそれぞれ 5 検体の協力調査を行った。対象施設での牛肝臓検査合格率は約 66%、自治体管内あるいは近隣自治体管内からの搬入割合は約 87%であった。牛肝臓は解体後、速やかに専用の吊下げレーンで運搬・検査を受けていた。

表面からの検出状況として、夏季には、一般細菌数平均値が $1.4 \times 10^3 \text{CFU}/100 \text{ cm}^2$ となり、冬季の同数値 1.9×10^2 よりも高い傾向にあったほか、実質 1 箇所より腸内細菌科菌群が検出された(冬季には検出されず)。なお、

胆汁からはすべての指標菌は不検出であった。

(iii) 自治体 C

昨年度は牛肝臓等の検体をとちく施設で採材後、冷媒を入れた発泡スチロール箱を用いて 3 時間程度冷蔵輸送した後、試験に供しており、採材後に氷を用いた急速冷却処理等を行うことはできなかった。これと呼応するように、細菌試験成績は他施設に比べて相対的に高い指標菌数値であったことから、保管・輸送状況による細菌汚染状況への影響を評価するため、本年度は当該自治体の協力を得て、採材後の速やかな試験を実施した。

対象施設の牛肝臓検査合格率は約 80%、当該自治体あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 85%であった。

同自治体では夏季・冬季でそれぞれ 5 検体を採材対象としたが、実質切出しの際に、夏季 1 検体、冬季 1 検体ではそれぞれ内部に膿瘍を認めため(左葉限局性)、健常検体対象から削除した。

肝臓表面の一般細菌数平均値は夏季では $3.6 \times 10^2 \text{CFU}/100 \text{ cm}^2$ 、冬季で $3.2 \times 10^4 \text{CFU}/100 \text{ cm}^2$ であった。胆汁はすべての指標菌が不検出であった。また、実質からは、夏季検体の実質右葉 1 箇所より、 $5.0 \times 10^0 \text{CFU}/\text{g}$ と少数の一般細菌の検出を見たものの、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌はいずれも検出されなかった。冬季の実質については一般細菌を含めたすべての指標菌が不検出であった。

一方、異常を認めた 2 検体については、いずれも高い実質内からの腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の汚染を認めた。

(iv) 自治体 D

今年度からの協力を得て、夏季 5 検体、冬季 5 検体を対象とした検討にあたった。対象施設での採材から試験開始までの所要時間は約 45 分から 1 時間 50 分で、清浄な金属バットに受け取った後、ビニール袋に入れ、冷媒を入れたクーラーボックスで 10 以下を確保しつつ、検査室へ搬送された。なお、同施設での牛肝臓検査合格率は約 98%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 98%であった。

対象施設での検討成績としては、夏季・冬季間で大きな差異を認めず、夏季の実質 1 検体及び冬季の胆汁 1 検体を除き、実質及び胆汁から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌は検出されなかった。一般細菌については、10 頭中 8 頭の実質及び 1 頭の胆汁より検出されたものの、同菌数の最大値は $2.3 \times 10^3 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ と大きな数値ではなかった。

(v) 自治体 E

本年度からの協力を得て、夏季 5 頭、冬季 5 頭の検討を行った。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は 1 時間 ~ 1 時間 50 分であり、とたいより摘出された肝臓は、肝臓運搬用フックに掛け、検査台へ運搬し、検査合格後にフックから外して水洗したものを清浄なビニール袋に入れ、氷を入れたクーラーボックスで冷却輸送された。同施設での牛肝臓検査合格率は約 45%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 99%であった。

対象施設での成績として、実質及び胆汁については腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌

のすべてが不検出であった。一般細菌数については、冬季の 3 頭分の実質及び 2 頭分の胆汁より検出され、両部位の最大値はそれぞれ $7.5 \times 10^3 \text{CFU/g}$ 、 $2.7 \times 10^4 \text{CFU/ml}$ であった。また、表面における一般細菌数は夏季平均が $5.0 \times 10^2 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ 、冬季平均が $1.5 \times 10^2 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ と前者がやや高い数値ではあったものの、統計学的有意差は認められなかった。

(vi) 自治体 F

昨年度と同様の採材及び試験までの保管輸送にあたった（昨年度の自治体 C）。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が 30 分 ~ 1 時間 30 分、冬季が 2 時間 ~ 3 時間であった。採材を行った夏季 5 頭、冬季 5 頭分の肝臓のうち、それぞれ 2 頭分については、鋸屑肝、一部被膜破損、膿瘍等の異常が認められたため、細菌試験の対象からは除外した。

実質における指標菌分布については昨年度と同様、右葉からの検出数は左葉に比べて高い傾向にあり、腸内細菌科菌群数及び大腸菌群数の最大値は $2.6 \times 10^3 \text{CFU/g}$ 、 $1.5 \times 10^3 \text{CFU/g}$ であった。大腸菌はすべての肝臓実質検体で不検出であった。

一般細菌数は、実質において腸内細菌科菌群や大腸菌群と同様に右葉で左葉よりも高い傾向を示した。また、季節別では夏季により高い菌数を認めた。表面においても、同様に夏季で高い菌数を示し、最大値は $1.3 \times 10^3 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ であった。なお、胆汁からはすべての指標菌が不検出であった。

(vi) 自治体 G

本年度からの協力を得て、夏季 6 頭、冬季 2 頭の検討を行った。このうち夏季 1 頭分については、軽度の胆管炎を認めたことから、健常牛由来検体からは排除した。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季で 5 分～40 分、冬季は 1 時間 25 分～2 時間 30 分であった。とたいより摘出された肝臓は、肝臓用のトレイに入れて検査台へ運搬し、検査合格後、清潔なビニール袋に入れて、氷を入れたプラスチックコンテナに移し、採材から 10 分以内に試験室へ搬送していた。同施設での牛肝臓検査合格率は約 54%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 92%であった。

実質からの腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検出された個体は夏季 2 頭分、冬季 1 頭分であり、最大値は腸内細菌科菌群が 1.7×10^4 CFU/g、大腸菌群及び大腸菌が 9.5×10^3 CFU/g であった。右葉・左葉間でこれら糞便汚染指標菌の分布に有意差は認められなかった。実質からこれらが検出された夏季の 1 個体では、胆汁からも検出され、その最大値は腸内細菌科菌群が 8.1×10^5 CFU/ml、大腸菌群及び大腸菌は共に 7.2×10^5 CFU/ml とほぼ同等であった。肝臓表面における各指標菌のうち、一般細菌数については実質及び胆汁中の数値とは相関性を示さなかったが、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の表面における定性検出成績は実質のそれと相関性を示したほか、総胆管近位部における実質の各糞便汚染指標菌数は遠位部に比べて高い数値を取る傾向にあった。

(vii) 自治体 H

昨年度に引き続き、同様の採材及び試験までの保存輸送方法により対応した(昨年度の自治体 D)。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が 5 分～15 分、冬季が 10 分～1 時間 45 分であった。なお、対象施設の牛肝臓検査合格率は約 80%、当該自治体あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 80%であった。

採材を行った夏季 5 頭、冬季 5 頭分の牛肝臓等について細菌試験を行ったところ、夏季の 1 頭分の牛肝臓実質より、 35 CFU/g の腸内細菌科菌群が検出された。当該検体において、大腸菌群及び大腸菌は陰性であった。冬季 5 頭分については、全ての糞便汚染指標菌は実質で検出されなかった。腸内細菌科菌群陽性個体の胆汁からは糞便汚染指標菌はいずれも不検出であった。

(viii) 自治体 I

昨年度と同様の採材及び試験までの保管輸送にあたった(昨年度の自治体 E)。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が 50 分～1 時間 20 分、冬季が 55 分～1 時間 30 分であった。採材を行った夏季 6 頭、冬季 6 頭分の牛肝臓の全てが健常検体として取り扱われた。

実質における指標菌分布については夏季 1 頭分が右葉で腸内細菌科菌群及び大腸菌群陽性となり、同数値はそれぞれ 40 CFU/g 及び 5 CFU/g であった。冬季検体でも 1 頭分が腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が右葉・左葉共に陽性を示し、それぞれの最大値で 4.1×10^3 CFU/g、 3.8×10^3 CFU/g、 3.6×10^3 CFU/g であった。胆汁からは夏季 1 頭分を除き、一般細菌数を含む全ての指標菌が不検出であった。実質より腸内細菌科菌群

が検出された 2 頭分の牛肝臓表面からは実質で腸内細菌科菌群陰性であった牛肝臓に比べ、相対的に高い腸内細菌科菌群数を認めた ($6.8 \times 10^3 \text{CFU}/100\text{cm}^2$ 、 $1.9 \times 10^5 \text{CFU}/100\text{cm}^2$)。

(x) 自治体 J

本年度より研究協力者として参加となった。対象施設では、とたいより肝臓を摘出後、赤物検査用フックにかけ、約 5 分後に内臓検査場所で表面ふき取りを実施し、結束バンドで胆嚢管を結紮した。その後、ビニールを敷いたバットに肝臓を受け、保冷剤を入れたクーラーボックスまたは発泡スチロールに入れて検査室に搬入した。同施設における採材から試験開始までの時間は 8 分から 26 分であった。なお、同施設における牛肝臓の検査合格率は約 70%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 90%であった。

採材対象検体数は夏季 5 頭、冬季 5 頭とした。このうち、6 頭分の牛肝臓実質からは腸内細菌科菌群が検出され、最大値は夏季が $65 \text{CFU}/\text{g}$ 、冬季が $600 \text{CFU}/\text{g}$ であった。また、大腸菌群は夏季 1 頭分、冬季 2 頭分より検出され、最大値は $480 \text{CFU}/\text{g}$ であった。大腸菌は冬季 1 頭分で検出され、その最大値は $160 \text{CFU}/\text{g}$ であった。なお、一般細菌は 1 頭分を除くすべての牛肝臓実質から検出された。以上の指標菌の左・右葉における菌数分布に有意差は認められなかった。実質左右葉で腸内細菌科菌群が認められた夏季 2 頭分の胆汁からは同様に腸内細菌科菌群が検出されたが、限局性に実質から同菌が検出された牛肝臓の胆汁は陰性を示した。

3. 腸内細菌科菌群の胆汁及び肝実質における分布の相関性

腸内細菌科菌群が肝実質より検出された個体の各部位での同菌個体別あるいは部位別汚染状況を比較検討するため、分担報告書 図 16 を作成した。胆汁検体に同菌の高濃度汚染が認められる個体では、肝実質左右両葉にわたっての同菌汚染を認めることが明らかとなった。しかしながら、肝実質における本菌の高濃度汚染は胆汁での同菌汚染を可逆性をもって指し示すものとは言い難いことも同時に示された。

4. 異常肝臓における指標菌分布

とたいからの摘出後に何らかの異常を示した計 6 頭分の牛肝臓等については、鋸屑肝、被膜の破損、膿瘍、胆管炎等の診断が下された。これらの指標菌検出成績概要には分担報告書 図 16 に記したとおりである。このうち、肝実質内に膿瘍を認めた 2 頭分の肝臓等については、膿瘍局在部位に腸内細菌科菌群の高い分布を認めたが、胆汁からは不検出であった。同指標菌は衛生指標としての位置づけのみならず、と畜検査における剖検診断の根拠としても有用であると考えられた。一方、鋸屑肝や被膜破損等を示した牛肝臓等については、糞便汚染指標菌の増加を認めなかった。

5. 胆嚢を結紮・除去せずに冷蔵輸送された牛肝臓内部及び胆汁の細菌検出状況

自治体 C 管内の施設で衛生的に採材後、胆嚢を結紮・除去せずに一夜かけて冷蔵輸送した牛肝臓等検体における細菌汚染状況を到着日(解体翌日)に検討した。表 3 に示した通り、計 5 か所から採材した実質右葉での

腸内細菌科菌群数は平均 3.8×10^4 CFU/g と、衛生的な採材を行い、胆嚢を結紮または除去後、速やかに供試した検体に比べ、高い値を示した。また、胆汁における同菌数については更に高値を示し、平均値は 1.6×10^6 CFU/mL であった。

(2) 牛肝臓の冷蔵保管中の温度変化と牛胆汁の細菌動態

1. 肝臓表面及び内部の温度変化

摘出直後の肝臓の温度は表面内部ともに 39 前後あるが、氷水中に 10 分間浸漬することで表面は 20 前後まで低下がみられた。しかし、氷水から取り出すと急速に約 25 まで上昇し、その後は、内部の温度変化と同様に徐々に低下していった。この変化は、3 検体のすべてで同じ傾向であり、内部の温度が 5 となったのは、約 20 時間後であった。一方、10 cm 角にした場合には、2 時間で 20 以下、5 時間で 5 にまで低下した。(分担報告書 図 1)

2. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群濃度

胆汁 41 検体中 5 検体 (12%) から腸内細菌科菌群が分離され、その濃度は、 $6.4 \sim 7.4$ log cfu/mL と高濃度であった。供試された牛は、7 都道府県に所在する農場から出荷されていたが、腸内細菌科菌群の有無と、牛個体の出荷地域、性別、去勢の有無との間に関連性は見られなかった(分担報告書 表 1)。

3. 胆汁中におけるサルモネラ増殖

ミュラー・ヒントン寒天培地で発育させたサルモネラを添加した場合でも、ミュラー・ヒントン培地で発育させたサルモネラを添加した場合でも、胆汁とミュラー・ヒン

トン培地における増殖曲線は同じであった (38)。一方、20 で培養すると、5 時間後も菌数増加は 10 倍未満であった(分担報告書 図 2 及び 3)。

(3) 放射線照射

1. 照射試料の配置と線量分布

牛肝臓試料 (25 g, 厚さ約 14mm) の中心にアラニンペレットを封入し、ガスバリア袋で包装後、発泡スチロール容器 (外径 (436 mm(横) × 276 mm(縦) × 136 mm(奥行き))、内径 (400 mm(横) × 240 mm(縦) × 100 mm(奥行き)) の蓋の裏側に密着するように 2 段に 5 個ずつ計 10 個 配置し、背面からドライアイス当てることを想定してクッションで押さえた(分担報告書 図 1)。この模擬試料入れた 3 つの試料箱 ~ それぞれを、肝臓試料の距離方向の中心位置を、図 2 上に示すように、照射室内の線量率の基準線とあわせ、試料箱の高さ方向の中心位置はコバルト線源の中心位置 (22.5 cm) に合わせて設置した。この模擬資料について約 10 kGy の照射を行った。その際、均等な照射を行うため、照射時間の半分の時間で、同位置において肝臓試料の前後を 180 度回転させ、両面から照射を行った。

分担報告書 図 2 下段に、各試料箱中に配置した、各資料箱中の 10 個の試料の中心部および試料表面の線量測定の結果を示す。試料中心および両表面に取りつけた線量計の吸収線量はほぼ等しく、肝臓試料の厚さ方向を中心反転させる両面照射で、いずれの肝臓試料 (25 g) においても、ほぼ均一な線量分布が得られていることが確認された。照射室の両脇に配置した箱 および箱 では、肝臓試料中心の線量は、9.8~12.3 kGy

と広範な分布となった。これは、照射室内の線量分布ライン(曲線)と箱内試料の試料位置(直線)が合わず、同一線量分布の曲線より、線源に近い部分の線量が高くなったためである。

線源正面に配置した試料箱 における 10 個の肝臓試料の中心部および表面も含めた全体の分布は、9.65~10.2 kGy の範囲であり、箱内での線量分布の最大/最小線量比は 1.06 と得られた。また、箱外側の基準位置で測定した線量は、9.88 kGy であり、これを 1 とすると、肝臓試料の線量比は 0.977~1.03 となり、箱 の設置位置での照射は、十分に均一な線量分布が確保出来るものと判断し、以降、基本的にこの設置位置を使って両面照射による微生物試験を行った。

2. 牛肝臓中における *E. coli* O157 ならびに *Salmonella* のガンマ線による殺菌効果

牛肝臓に接種した $10^4 \sim 10^7$ CFU/g の *E. coli* O157 ならびに $10^5 \sim 10^7$ CFU/g の *Salmonella* をドライアイス下、脱気包装条件において規定の線量で死滅が可能を検討した。分担報告書 図 3, 4 に *E. coli* O157 および *Salmonella* の γ 線照射による推定死滅曲線と、その 95% および 99% 予測信頼区間を示した。すなわちこの信頼区間以上の条件で γ 線を曝露すると、その信頼度で低減可能であると予想された。これを確認するため、*E. coli* O157 ならびに *Salmonella* の菌液を 10^{5-7} CFU/g の濃度となるよう接種した牛肝臓について、様々な γ 線量で曝露した際の検出結果を同図上に示した。

分担報告書 図 3 に *E. coli* O157 の検出結果を示した。予想通り、95% 信頼区間内では生残する検体が確認され、この区間内では

死滅と生存の境目にあると考えられた。また、95% 信頼区間外の高い γ 線量曝露域では全ての検体で不検出となった。分担報告書 図 4 では *Salmonella* についての検出結果を示した。ここでは、前項の箱 の設置位置で接種菌数と線量を変えた 5 検体の判定結果に加え、箱 、箱 の位置に 2×10^5 または、 2×10^7 CFU/g の *Salmonella* を接種した際の 1 検体ごとの検出結果を合わせてプロットしている。*Salmonella* においても同様に 95% 信頼区間内では生残する検体が確認され、99% 信頼区間外の高い γ 線量曝露域では全ての検体で不検出となった。

3. 自然汚染試料におけるガンマ線照射予備試験

非接種区においてもガンマ線の菌数低減効果を確認するため、その予備的検討を行った。1 頭分の牛肝臓から切り分けた 5 個の非接種検体について、ドライアイス下脱気包装にて 7 kGy 照射し、1 晩増菌後に、標準寒天平板および VRBG 平板で検出した結果は、すべて陰性であった。なお、この肝臓の照射前の微生物試験結果は、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数について、それぞれ、 3.8×10^4 、 3.8×10^4 、 9.7×10^4 、 3.6×10^4 CFU/g、であった。

(4) 高圧処理

1. 高圧処理時の温度による菌数低減の効果

食肉への汚染が知られているグラム陰性菌であるサルモネラ属菌と、グラム陽性菌のリストeriaについて、高圧処理を行う際の高圧容器の温度が菌数低減効果に与える影響を調べた。その結果、サルモネラ属菌は 25 で $1.5 \sim 2.1 \log$ 、37 で $3.2 \sim 3.6 \log$ 、42

で 5.2~6.4 log の低減を示した(分担報告書 図 1-1)。リステリアモノサイトゲネスでは、25 で 6.0~6.6 log、37 で 7.0~7.7 log、の低減を示し、42 では定量法の検出限界以下となったものの、増菌培養により菌が検出され、完全な死滅とはならなかった(分担報告書 図 1-2)。また、非選択寒天平板上と選択分離培地寒天平板上の集落数を比較したところ、いずれの条件でも選択分離寒天平板上の集落数が非選択寒天平板上の集落数よりも大幅に低下しており、高圧処理により損傷菌が多く発生していることが示された。

2. 高圧処理時の温度が牛肝臓の肉質変化に及ぼす影響

1. と同じ条件で牛肝臓の高圧処理を実施したところ、25 での高圧処理により、硬度の指標である最大破断点(N 値)が 5.655 から 5.332 になっており、ほとんど変化が見られなかった。37 の処理においても、5.706 から 5.431 と変化が少なかったが、42 の処理では 3.608 から 1.542 と大幅に軟化していた(分担報告書 図 2)。高圧をかけない加温のみの処理では、37 で 5.780 から 3.218、42 で 4.123 から 3.437 と、軟化する傾向を示していた。色調変化については、25 での高圧処理により、明るさの指標である L 値が 28.0 から 44.0、黄色みの指標である b 値が 7.2 から 11.3 に増加したものの、赤みの指標である a 値は不変であった。37 及び 42 の処理においても同様の傾向を示したが、25 処理と比較して、両者とも b 値がより高い数値を示していた。肉眼による観察では、高圧をかけることで白化し、温度を上げることでより白みが強くなる傾

向が見られた。一方、高圧をかけない加温のみの処理では、L 値、b 値共に変化がほとんど見られず、肉眼による観察でも加熱による色調の大きな変化は見られなかった。

D. 考察

今年度の本研究では、牛肝臓の細菌汚染実態について 10 自治体の協力を得て、食肉センターでとさつ・解体された直後にとちく検査員(獣医師)の監視指導の下、衛生的に取り出した牛肝臓等を対象として、検討を行った。施設別成績として、肝実質から腸内細菌科菌群が検出された検体は計 8 施設で認められた。残り 2 施設(自治体 A 及び C)で採材された検体は異常症例を除き、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がいずれも陰性を示し、衛生的な採材から検体確保、試験実施等が行われたことが示唆された。

このうち、自治体 C では昨年度肝実質で高い腸内細菌科菌群数を認めたが、本年度は採材から試験までを同自治体担当者の積極的な協力により実施に至った。昨年度と本年度の間で認められた成績の差異の推定要因としては、採材から試験開始までの時間短縮及び検体の安定的な温度管理等が挙げられる。すなわち、牛肝実質の衛生確保においては、採材方法を考慮しつつ、衛生的施設設備環境下で、速やかな加工処理を進めることが実効性を持つ手法として設定できる可能性を示唆するものと考えられる。

この他の昨年度との変更点としては、細切器具の違いが挙げられる。すなわち昨年度、自治体 C(本年度は自治体 F とした)では肝実質細切時に夏季・冬季で異なる細切器具を用いており、これが影響していたためか、両季節間で細菌検出成績が大きく異なって

いたことが導入の背景にある。ディスポーザブルタイプのレーザーによる条件の更なる統一化を行ったが、当該自治体の夏季成績は冬季成績に比べ、前年度と同様に高い数値にあった。夏季は、輸送・搬入・繋留時に牛生体が外的ストレス等を受けやすい状況にあり、とちく前段階における生体側の環境依存性とも思える挙動が細菌検出状況に影響を及ぼしているとも考えられる。

異常を呈する牛肝臓等の検証は各自治体のとちく検査員により実施されている、と畜検査により排除されうるものであるが、牛肝実質等の食品としての安全性確保にあたっては、同マトリックスにおける腸内細菌科菌群等の汚染が極力ないものを選定し、更に応用手法による細菌汚染低減効果を最大限に活用することが有効な手立てと考えられる。仮に生食等に供することを想定する場合には、最終製品において腸内細菌科菌群に係る検証試験を設定することは必要不可欠な事項と考えられるが、製造基準等には簡易に採材できる、胆汁等を用いた腸内細菌科菌群の試験成績を併用することで、微生物学的品質の確保につながるロジックとなりうるものと思われる。

実際に、胆嚢を結紮・除去せずに長時間低温輸送・保存した場合の腸内細菌科菌群数の分布成績は、胆汁が媒体となり腸内細菌科菌群をはじめとする糞便汚染指標菌の実質への拡散を助長することを示唆するものといえよう。肝実質における細菌の拡散・増殖を抑制するための衛生的管理には速やかな胆嚢の除去が必須であるが、同部位のスクリーニング部位としての活用は今後の更なる検討により明らかにされると考えられる。

また、肝臓内での細菌増殖を抑制するための管理手法として、多くの内臓取扱業者では摘出後の肝臓を丸ごと冷蔵庫に保管しているが、今年度の研究において、丸ごとでは内部温度を急激に下げることができず、肝臓内部に細菌汚染があった場合、20 以下に下がるまでの間に汚染細菌が増殖してしまう可能性が高いことが判明した。また、氷水中に10分間程度浸漬する処理は、表面温度を一時的に下げる効果しかないことが判明した。今回の調査でも、1割強では胆汁に高濃度(6.4 log cfu/mL以上)の腸内細菌科菌群の汚染が認められ、これら腸内細菌科菌群によって肝臓内部が汚染されていると考えられることから、生食用として牛肝臓を提供するためには、原料となる牛肝臓内部の細菌汚染状態を摘出直後から悪化させないようにする必要があり、摘出後はなるべく早くカットし、急冷する必要があると考えられた。今後は、カットの大きさ及び適切な急冷方法について検討を行う必要があると思われた。放射線照射については、今回の検討で *E. coli* O157、*Salmonella* 共に、予想通り95%信頼区間内では生残する検体が確認され、この区間内では死滅と生存の境目にあると考えられた。また、*E. coli* O157では95%信頼区間外の高い γ 線量曝露域では全ての検体で不検出となった。*Salmonella*においても99%信頼区間外の高い γ 線量曝露域では全ての検体で不検出となった。仮に 10^5 CFU/gの*Salmonella*を95%および99%予測信頼区間で低減するのであれば、8.2~8.5 kGyの照射により達成が可能であり、この現象を接種回収試験により確認できた。このようにこれまでの研究成果にて得られた生残曲線に95%および99%予測信頼区間

を設け、その結果を基にガンマ線曝露線量を決定することが妥当と考えられた。また、自然汚染試料におけるガンマ線照射予備試験をおこなった。一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数について、それぞれ、 3.8×10^4 、 3.8×10^4 、 9.7×10^4 、 3.6×10^4 CFU/g、であった 1 頭分の牛肝臓から切り分けた 5 個の非接種検体について、ドライアイス下脱気包装にて 7 kGy 照射し、1 晩増菌後に、標準寒天平板および VRBG 平板で検出した結果は、すべて陰性であった。今後、さらに、自然汚染試料についての殺菌効果の確認を行うとともに、流通を念頭においた試料の形体における商業照射施設での照射における線量分布の検証が必要である。

高圧処理については、今回の検討により、高圧処理時の温度を 25 から 37 に上昇させることにより、サルモネラ属菌では 50 ~ 100 倍、リステリアでは 10 倍程度の菌数低減効果が見られた。また、処理温度を 42 にすることにより、さらに高い菌数低減効果が見られたものの、高圧と温度の組み合わせ処理により、牛肝臓の変色も強くなることが明らかとなった。一方、25 における菌数低減効果はサルモネラで 2log、リステリアでは 5.5log であり、サルモネラの方がより高圧耐性が高いことが示された。また、選択分離培地上の集落数と非選択培地上の集落数の差はサルモネラで 4log 以上、リステリアで 2log 以上見られ、高圧処理による損傷菌はサルモネラでより発生しやすいことが示された。以上の結果を踏まえ、次年度の検討は、2log の菌数低減効果を保ちつつ牛肝臓の変色をより少なくするために、25 と 37 の間の温度帯での高圧処理と、前年度検討した高圧処理後の冷凍保管の組み合わ

せ等の検討を行う。更に、今後高圧処理の実用化に当たっては、食品の変色、硬さの変化を最低限にすると共に、損傷菌の発生を最小限にしつつ、殺菌効果の検証において損傷菌を高感度に検出する手法を用いることが、食品の衛生確保上重要であると思われた。

E. 結論

汚染実態調査については、計 93 頭分の健康牛肝臓等を調査し、以下の知見を得た。

- ・STEC 及びサルモネラ属菌は全検体で陰性となった。
- ・衛生的に摘出・管理した牛肝実質における腸内細菌科菌群の最大菌数は 4.3×10^4 CFU/g であった。
- ・採材後の速やかな胆嚢除去及び温度管理が汚染拡大防止に有効であることを示す知見が得られた。
- ・肝臓実質より腸内細菌科菌群が検出された個体は 14 頭 (15.1%) であり、うち、実質の左右葉共陽性となった検体では胆汁も陽性となり、高濃度実質汚染検体の探知のための胆汁スクリーニング検査の有用性が示唆された。
- ・肝臓実質に異常が認められた個体の胆汁はいずれも腸内細菌科菌群陰性であり、疾病探知にはと畜検査員による検査が重要な意義を有することが改めて示された。

摘出後の肝臓の温度動態については、以下の知見を得た。

- ・現在多くの内臓取扱業者で行われている肝臓丸ごとの冷蔵保管では、肝臓内部の温度が 5 以下になるまでに 20 時間を要した。
- ・肝臓を 10cm 角に細切した場合は、5 時間程度で 5 以下となった。

胆汁内の腸内細菌科菌群濃度及び胆汁内におけるサルモネラの増殖性については、以下の知見が得られた。

・胆汁 41 検体中 5 検体 (12%) から腸内細菌科菌群が分離され、その濃度は 6.4 log cfu/mL 以上であった。

・38 において、サルモネラは胆汁中で人工培地内と同様の増殖を示し、30 においても増殖していた。20 では増殖は緩やかであった。

・以上より、肝臓摘出後に肝臓丸ごとで保管・流通する場合には、例えば、低温かつ低濃度の細菌汚染であっても、肝臓内部の細菌汚染は速やかに拡大すると考えられ生食用として牛肝臓を提供する際には、可能な限り早期にカットし、急冷する必要があると思われる。

放射線照射については、以下の知見が得られた。

・牛肝臓に $10^5 \sim 10^7$ CFU/g の *E. coli* O157 もしくは *S. Enteritidis* を接種し、4.0~8.1、8.0~12.3 kGy の範囲のガンマ線を照射した場合での生残試験を行ったところ、昨年度までの研究で得た生残曲線に予測信頼区間を設け、その予測信頼区間上限の結果から、*E. coli* O157 は 5.3~5.5 kGy、*S. Enteritidis* は 8.2~8.5 kGy の照射により 95% から 99% の信頼度で 10^5 CFU/g を低減させることが可能であると考えられ、ガンマ線による照射試験の結果はその予測を反映していた。

高圧処理については、以下の知見が得られた。

・牛肝臓中の高圧処理を行う際に 37 以上の加温条件下で行うことで、食中毒菌の菌数低減効果を大幅に高めることが可能となっ

たが、今回実施した条件では肝臓の色調に強い変化が見られた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

原著論文

1) 川崎晋、齋藤美枝、持田麻里、等々力節子、牛肝臓内部における *Campylobacter jejuni* の γ 線照射による殺菌効果, 日本食品科学工学会誌、印刷中

2) H Ogihara, H Suzuki, M Michishita, H Hatakeyama, Y Okada. (2017) Effects of high hydrostatic pressure processing on the number of bacteria and texture of beef liver. *Journal of Food Quality*, ID7835714, 7 pages

学会発表

1) 岡田由美子、鈴木穂高、百瀬愛佳 . 高圧処理による *Listeria monocytogenes* の損傷と耐性機構 . 第 91 回日本細菌学会 (2018 年 3 月)

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

平成29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）
「畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究」

分担研究報告書
牛肝臓等における細菌汚染実態に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究分担者	佐々木貴正	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
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
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	方波見佐知子	青森県十和田食肉衛生検査所
	藤森亜紀子	岩手県食肉衛生検査所
	相馬 要	千葉県東総食肉衛生検査所
	白木 豊	岐阜県食肉衛生検査所
	西部 尚史	岐阜市食肉衛生検査所
	久本千絵	兵庫県食肉衛生検査センター
	尾島康世	高知市食肉衛生検査所
	清島綾子	福岡県食肉衛生検査所
	川瀬 遵	島根県食肉衛生検査所
	城間 健	鹿児島県阿久根食肉衛生検査所

研究要旨：昨年度行った牛肝臓における細菌汚染部位及びその局材性等に関する知見の収集をより発展させるため、平成29年6月～9月（夏季）及び同年12月～30年2月（冬季）に、計10自治体が管轄する食肉センター（自治体A～J）でとさつ・解体された計98頭の肉用牛から、胆嚢を安定的に保持した状態で肝臓を可能な限り衛生的に取り出し、細菌試験に供した。このうち、自治体C・F・H管轄下の施設で採材された計5検体は胆管炎等を呈していたため、健常検体とは識別した。計93頭分の検体について、牛肝臓表面、胆嚢内胆汁、肝実質（右葉、左葉各2部位）の計6部位を対象とした衛生指標菌の定量試験を行ったところ、計76頭分（81.7%）の肝実質検体は腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の全てに陰性を示し、腸内細菌科菌群が検出されたものは計14頭分（15.1%）であった。昨年度、試験開始迄に約3時間の輸送時間を要した自治体Cでは本年度は採材直後に試験を行い、8頭分のうち、7頭分の肝実質で上述の糞便汚染指標菌が陰性となったこと、胆嚢を結紮・除去せずに一夜かけて冷蔵輸送を行った後の肝実質中の腸内細菌科菌群数は概ね 10^4 オーダーとなった状況等から、採材後速やかな牛肝実質を加工に供することが細菌汚染低減に資する対策の一つと目された。肝実質より腸内細菌科菌群が検出された計14頭（最大菌数 4.3×10^4 CFU/g）の肝臓等検体のうち、胆汁で同菌陽性を示した個体の肝実質では同菌の広範囲に亘る汚染が認められたことから、胆汁検査により、高い糞便汚染指標菌汚染分布を示す牛肝臓を排除できる可能性が示唆された。来年度は、上記の知見を踏まえ、胆汁検査の有用性ならびに製造（加工）基準として採材工程を含める意義を検証するため、代表的なとちく場で通常検査ならびに処理工程を経て出荷直前にある牛肝臓を対象に実質等での細菌汚染実態を調査し、同施設環境及び工程を通じた衛生管理対策の確保に資する知見の創出にあたりたい。

A. 研究目的

牛肝臓の非加熱形態での喫食については2011年に発生した生食用牛肉を原因食品とする腸管出血性大腸菌集団食中毒事件を受け、牛肉および牛内臓肉に関する細菌汚染調査等が進められ、牛肝臓の実質内より腸管出血性大腸菌が検出されたとの報告があったことから、2012年7月に牛肝臓を生食用として提供・販売することが禁止されたことは記憶に新しい。

カンピロバクター食中毒事例の発生動向としては、こうした措置を経た後、現在に至るまで、牛肉・牛内臓肉を原因食品とする当該食中毒事例の大幅な低減が図られており、こうした施策は食中毒発生予防の観点から有効な手立てであったと考えられる。その一方で、経済活動として牛内臓肉等を取り扱う事業者、あるいはその喫食を望む消費者も一定数存在しており、牛肝臓の生食提供措置の解除を目的として、これまでも様々な観点から、牛肝臓実質における細菌汚染低減に関する研究がなされてきた。

こうした検討を行う際には、細菌汚染低減目標値の設定が必要不可欠であり、そのためには、牛肝臓実質における細菌汚染実態を精査し、部位、季節性、衛生管理手法等の多様性を考慮に入れつつ、最適かつ応用可能な対策を講じる必要があると思われる。牛のとちく・解体を行う食肉センター等については全国に多数存在しており、その施設規模、構造、管理運営基準等には一定の基準はあるが、多様性も含んでいる。先行研究においては、単独施設での検討成績が挙げられ、季節性や部位別の汚染状況に関する知見が集積されてきたところである。その一方で、施設間での多様性等を含

めた見解を得るには至っておらず、その成績の創出が期待されている。

こうした背景を踏まえ、本研究では、採材対象を提示した上で複数の施設(自治体)の協力をより発展的に求めつつ、とさつ・解体直後に通常の処理工程とは異なる方法で、可能な限り衛生的に採材した牛肝臓を対象として、衛生指標菌の定量試験および主要病原細菌である志賀毒素産生性大腸菌(STEC)ならびにサルモネラ属菌の定性試験を実施したので、報告する。

B. 研究方法

本研究では、計10自治体(A~J)の協力を得て、以下の試験を実施した。

1. 牛肝臓検体の条件等

検体は、以下の条件を満たすものとした。

- (i) 採材対象とする牛個体は、概ね36ヶ月齢以下の未経産雌または去勢雄の交雑種または黒毛・褐毛和種であること。
- (ii) 当該個体は、自治体管内あるいは隣接管内で生産され、とちく当日あるいは前日に輸送されたものであること。
- (ii) 生体検査において異常を認めない個体であること。
- (iii) 内臓検査において異常を認めず、被膜の大きな損傷がないこと。
- (iv) 胆嚢に損傷がなく、胆汁が十分に満たされていること(肉眼的に胆汁の漏出がないことが望ましい)。

肝臓の採材にあたっては、食肉センターでとちくされた、牛と体より、腹側正中線を切開した後、胆嚢を保持した肝臓を可能な範囲で衛生的に取り出し、胆嚢と総胆管の間を外側から絹糸等で縛り、胆汁の漏出を制御するように努めた。その後、速やか

に 10 度以下の温度帯で検査室に搬送し、次項の手順に従って、部位毎の採材を行った。各施設での採材手順、搬入条件(温度、時間)等についてはその都度記録した。

2. 検体調整等

搬送された牛肝臓については、以下の手順で可能な限り無菌的に部位別に切り分け、検体とした(図1~5)。

1) 採材方法等について

検体入手後は、速やかに胆嚢管を結紮し、胆汁の漏出防止に努めた。以後の作業に着手する迄の間は、10℃以下で冷蔵保存を行い、個体識別番号を記録した。複数検体を同日に処理する場合には、1頭分ごとにビニール袋に入れる等して、交差汚染の防止に努めた。

2) 採材部位及び前処理

肝臓左葉表面 1ヶ所(検体部位番号 1)、胆汁(検体部位番号 2)、実質左葉 2箇所(検体部位番号 3,4)、実質右葉 2箇所(検体部位番号 5,6)の計 6 部位を無菌的に採材した。以下に各部位の採材方法を述べる。

表面拭き取り(検体部位番号 1)

肝臓全体が載る大きさのバットやまな板等にラップ等を敷き、肝臓・胆嚢検体を図1のように配置した。左葉中心部に 10cm x 10cm の拭き取り枠をあて、拭き取り検査キットを用いて、指示書に従って拭き取り操作を行う。採取検体は試験に供する迄、10℃以下又は氷上で保存・輸送した。検体を試験に供するまでの時間は概ね 3 時間以内とした。表面拭き取りについては、肝臓摘出直後に実施することも可とした。

胆汁(検体部位番号 2)

19.5 G の滅菌済注射針を 10 mL 容の滅菌

済ディスポ注射筒に装着し、予め表面を 70%エタノールで消毒した胆嚢表面に穿刺し、10 mL 以上の胆汁を回収した(図2)。回収した胆汁は 15 mL の滅菌遠心管(A-2等のラベルを行う)へ移し変え、試験に供するまで 10℃以下または氷上で保存し、概ね 3 時間以内に試験に供することとした。

肝臓実質(検体部位番号 3~6)

消毒済の刃物を用いて左葉を切り離し、左葉中央部を切り出した後、切り出した左葉外側(検体番号3とする)及び左葉内側(検体番号4)を切り出し、それぞれ滅菌シャーレに取り分けた(図3)。その後、上下反転させ、右葉を切り離した。左葉と同様に右葉中央部を切り分け、右葉内側(検体番号5)及び右葉外側(検体番号6)を切り出し、滅菌シャーレに取り分けた。なお、切り出すブロックの大きさの目安としては、少なくとも各辺5cm以上とした。

滅菌済ディスポーザブルタイプのメス及びピンセットを用いて、検体番号3~6の表面(シャーレに接する底面以外の5面)から 1 cmを目安に切り出した(図5)。この際、滅菌済メス及びピンセットは1面切ると共に、70%エタノール及び滅菌水による消毒洗浄を行った。その後、底面より1cm上部を切り取り、新しい滅菌シャーレに移した。同ブロックの重量を計測しながら、10gとなるよう調整し、滅菌ストマッカー袋に40 mLの緩衝ペプトン水と共に加えた。1分間ストマッキング処理を行い、検体懸濁原液を調整した。

3. 衛生指標菌の定量試験

衛生指標菌の定量にあたっては、9mL 容の滅菌 PBS を用いて各検体の 10 倍階段希

積列を作成した。その後、各 1mL の試験溶液を、3 種類のペトリフィルム (RAC プレート、EB プレート、EC プレート)(3M) に接種し、指示書に従って培養・計数を行うことで、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数を求めた。

4. DNA 抽出

上記 2. で調整した検体懸濁溶液 0.5mL より、Cica Genious Total DNA prep kit (関東化学)を用いて、DNA 抽出を行った。

5. STEC 及びサルモネラ属菌の定性試験

上記 2. で調整した懸濁溶液残液を 37 にて 18 時間培養後、培養液 1mL を 1.5mL 容エッペンドルフチューブに分注した。16,000 x g 以上で 5 分間遠心後、上清を取り除き、沈査に 100 μ l 滅菌蒸留水を加えて、95 にて 5 分間加熱し、DNA 抽出液を作成した。これを鋳型として、サルモネラ属菌及び STEC の *stn* 遺伝子及び *stx* 遺伝子を PCR 法により検出した。

6. 胆嚢を結紮・除去せずに、チルド輸送した牛肝臓の細菌汚染実態調査

自治体 C で衛生的に採材した牛肝臓検体を、胆嚢を結紮・除去せずに、当所まで一夜かけてチルド輸送し、肝臓実質及び胆汁の細菌汚染実態について、上項 2.5 に準じて評価した。

C. 結果

10 自治体 (A~J) の協力を得て、各食肉センターでとちく解体された計 98 頭の牛肝臓検体を採取した。これらのうち、5 頭分の肝臓については、採材後に行われた

と畜検査により、胆管炎や膿瘍が認められたことから、異常検体として整理を行い、健全検体対象からは除外した。

1. STEC 及びサルモネラ属菌の検出状況

PCR スクリーニング試験の結果として、全ての供試検体 (98 頭 x 6 部位 = 306 検体) は、陰性を示した。

2. 衛生指標菌の検出状況

1) 部位別成績比較 (表 1 及び 2)

(i) 一般細菌

表面拭き取り検体では、計 93 頭分の牛肝臓表面における拭取り成績として、82 検体で陽性を示し (陽性率 88.2%)、陰性検体も含めた全体の平均値は 2.9×10^3 CFU/100cm² (最小値: 検出限界以下、最大値: 1.2×10^5 CFU/100cm²) であった。

胆汁検体については、計 13 検体が陽性を示し、最大値は 4.1×10^6 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、それぞれ 29 検体 (陽性率 31.2%) および 31 検体 (同 33.3%) が陽性を示し、実質全体での最大値は、 1.7×10^7 CFU/g、陰性検体も含めた全体の平均値は 3.6×10^2 CFU/g であった。

(ii) 腸内細菌科菌群

表面拭き取り検体のうち、38 検体では腸内細菌科菌群が検出され (40.9%)、最大値は 2.5×10^5 CFU/100cm² であった。

胆汁検体については、6 検体が陽性となった (陽性率 6.5%) が、最大値は 1.2×10^3 CFU/mL に留まった。

実質左葉・右葉検体では、9 検体および

11 検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 4.3×10^4 CFU/g であった。

(iii) 大腸菌群

表面拭き取り検体では、31 検体から大腸菌群が検出され（33.3%）、最大値は 1.2×10^4 CFU/100cm² であった。

胆汁検体では、4 検体が陽性となり（陽性率 4.3%）、最大値は 3.2×10^5 CFU/mL と腸内細菌科菌群よりも高値を示した。

実質左葉・右葉検体では、6 検体および 10 検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 3.0×10^2 CFU/g であった。

(iv) 大腸菌

大腸菌陽性を示した表面拭き取り検体は計 21 検体あり、最大値は 1.8×10^2 CFU/100cm² であった。胆汁検体は 3 検体が陽性となった。

実質左葉・右葉検体では、4 検体および 2 検体が陽性を示し、実質全体での最大値は、 3.6×10^3 CFU/g であった。

2) 施設別の成績比較（表 2 及び図 6-15）

(i) 自治体 A

自治体 A では夏季 5 検体、冬季 5 検体の検討を行った。同施設での採材から試験開始までの所要時間は 1 時間 30 分～2 時間 25 分であり、清浄なプラスチックコンテナを用いて採材し、表面拭取りならびに外科用糸を用いた胆嚢根部の結紮を行った後、大量の氷を入れた発泡スチロール箱内で庫内温度として 10 以下を保ちつつ搬送された。当該施設での牛肝臓検査合格率は約 69%、所属自治体管内あるいは隣接管内からの生体搬入率は約 8～9 割であった。

計 10 検体は表面を除く、胆汁・実質部位において、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が陰性を示した。肝臓表面の一般細菌数は夏季の平均値が 2.4×10^3 CFU/100 cm²、冬季が 2.1×10^2 CFU/100 cm² であった。腸内細菌科菌群陽性数も夏季が 3 検体であったのに対し、冬季は 1 検体のみにとどまっていた。

(ii) 自治体 B

自治体 B では夏季及び冬季でそれぞれ 5 検体の協力調査を行った。対象施設での牛肝臓検査合格率は約 66%、自治体管内あるいは近隣自治体管内からの搬入割合は約 87%であった。牛肝臓は解体後、速やかに専用の吊下げレーンで運搬・検査を受けていた。

表面からの検出状況として、夏季には、一般細菌数平均値が 1.4×10^3 CFU/100 cm² となり、冬季の同数値 1.9×10^2 よりも高い傾向にあったほか、実質 1 箇所より腸内細菌科菌群が検出された（冬季には検出されず）。なお、胆汁からはすべての指標菌は不検出であった。

(iii) 自治体 C

昨年度は牛肝臓等の検体をとちく施設で採材後、冷媒を入れた発砲スチロール箱を用いて 3 時間程度冷蔵輸送した後、試験に供しており、採材後に氷を用いた急速冷却処理等を行うことはできなかった。これと呼応するように、細菌試験成績は他施設に比べて相対的に高い指標菌数値であったことから、保管・輸送状況による細菌汚染状況への影響を評価するため、本年度は当該自治体の協力を得て、採材後の速やかな試

験を実施した。

対象施設の牛肝臓検査合格率は約 80%、当該自治体あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 85%であった。

同自治体では夏季・冬季でそれぞれ 5 検体を採材対象としたが、実質切出しの際に、夏季 1 検体、冬季 1 検体ではそれぞれ内部に膿瘍を認めたため(左葉限局性) 健常検体対象から削除した。

肝臓表面の一般細菌数平均値は夏季では 3.6×10^2 CFU/100 cm²、冬季で 3.2×10^4 CFU/100cm²であった。胆汁は 1 頭の検体で陽性となった。また、肝実質からは、夏季検体の実質右葉 1 箇所より、 6.3×10^0 CFU/g と少数の一般細菌の検出を見たものの、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌はいずれも検出されなかった。冬季の肝実質からは一般細菌を含めたすべての指標菌が不検出であった。

一方、異常を認めた 2 検体については、いずれも高い実質内からの腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌の汚染を認めた。

(iv) 自治体 D

自治体 D では、今年度からの協力を得て、夏季 5 検体、冬季 5 検体を対象とした検討にあたった。対象施設での採材から試験開始までの所要時間は約 45 分から 1 時間 50 分で、清浄な金属バットに受け取った後、ビニール袋に入れ、冷媒を入れたクーラーボックスで 10 以下を確保しつつ、検査室へ搬送された。なお、同施設での牛肝臓検査合格率は約 98%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 98%であった。

対象施設での検討成績としては、夏季・

冬季間で大きな差異を認めず、夏季の実質 1 検体及び冬季の胆汁 1 検体を除き、実質及び胆汁から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌は検出されなかった。一般細菌については、10 頭中 8 頭の実質及び 1 頭の胆汁より検出されたものの、同菌数の最大値は 2.3×10^3 CFU/100 cm²と大きな数値ではなかった。

(v) 自治体 E

自治体 E からは、自治体 D と同じく本年度からの協力を得て、夏季 5 頭、冬季 5 頭の検討を行った。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は 1 時間～1 時間 50 分であり、とたいより摘出された肝臓は、肝臓運搬用フックに掛け、検査台へ運搬し、検査合格後にフックから外して水洗したものを清浄なビニール袋に入れ、氷を入れたクーラーボックスで冷却輸送された。同施設での牛肝臓検査合格率は約 45%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 99%であった。

対象施設での成績として、肝実質及び胆汁については腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌のすべてが不検出であった。一般細菌数については、夏季 1 頭分の胆汁、ならびに冬季 3 頭分の実質と 2 頭分の胆汁より検出され、両部位の最大値はそれぞれ 7.5×10^3 CFU/g、 2.7×10^4 CFU/ml であった。また、表面における一般細菌数は夏季平均が 5.0×10^2 CFU/100cm²、冬季平均が 1.5×10^2 CFU/100cm²と前者がやや高い数値ではあったものの、統計学的有意差は認められなかった。

(vi) 自治体 F

自治体 F では昨年度と同様の採材及び試験までの保管輸送にあたった（昨年度は自治体 C とした）。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が 30 分～1 時間 30 分、冬季が 2 時間～3 時間であった。採材を行った夏季 5 頭、冬季 5 頭分の肝臓のうち、それぞれ 2 頭分については、鋸屑肝、一部被膜破損、膿瘍等の異常が認められたため、細菌試験の対象からは除外した。

実質における指標菌分布については昨年度と同様、右葉からの検出数は左葉に比べて高い傾向にあり、腸内細菌科菌群数及び大腸菌群数の最大値は 2.6×10^3 CFU/g、 1.5×10^3 CFU/g であった。大腸菌はすべての肝臓実質検体で不検出であった。一般細菌数は、実質において腸内細菌科菌群や大腸菌群と同様に右葉で左葉よりも高い傾向を示した。また、季節別では夏季により高い菌数を認めた。表面においても、同様に夏季で高い菌数を示し、最大値は 1.3×10^3 CFU/100cm² であった。なお、胆汁からはすべての指標菌が不検出であった。

(vi) 自治体 G

自治体 G からは、本年度からの協力を得て、夏季 6 頭、冬季 2 頭の検討を行った。このうち夏季 1 頭分については、軽度の胆管炎を認めたことから、健常牛由来検体からは排除した。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季で 5 分～40 分、冬季は 1 時間 25 分～2 時間 30 分であった。とたいより摘出された肝臓は、肝臓用のトレイに入れて検査台へ運搬し、検査合格後、清潔なビニール袋に入れて、

氷を入れたプラスチックコンテナに移し、採材から 10 分以内に試験室へ搬送していた。同施設での牛肝臓検査合格率は約 54%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 92% であった。

実質から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検出された個体はそれぞれ夏季が 2 頭分、2 頭分、1 頭分、冬季が共に 1 頭分であった。これらの最大値は腸内細菌科菌群が 3.9×10^2 CFU/g、大腸菌群及び大腸菌が共に 3.0×10^2 CFU/g であった。右葉・左葉間でこれら糞便汚染指標菌の分布に有意差は認められなかった。実質からこれらが検出された夏季の 1 個体では、胆汁からも検出され、その最大値は腸内細菌科菌群及び大腸菌群が共に 1.5×10^5 CFU/ml、大腸菌は不検出であった。同個体由来肝臓実質における各糞便汚染指標菌の分布は総胆管遠位部に比べ、同近位部でより高い数値を取る傾向にあった。

(vii) 自治体 H

自治体 H では昨年度に引き続き、同様の採材及び試験までの保存輸送方法により対応した（昨年度は自治体 D とした）。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が 5 分～15 分、冬季が 10 分～1 時間 45 分であった。なお、対象施設の牛肝臓検査合格率は約 80%、当該自治体あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約 80% であった。

採材を行った夏季 5 頭、冬季 5 頭分の牛肝臓等について細菌試験を行ったところ、夏季の 1 頭分の牛肝臓実質より、35CFU/g の腸内細菌科菌群が検出された。当該検

体において、大腸菌群及び大腸菌は陰性であった。冬季5頭分については、全ての糞便汚染指標菌は実質で検出されなかった。腸内細菌科菌群陽性個体の胆汁からは糞便汚染指標菌はいずれも不検出であった。

(viii) 自治体 I

自治体 I では昨年度と同様の採材及び試験までの保管輸送にあたった（昨年度は自治体 E とした）。対象施設における採材から試験開始までの所要時間は夏季が50分～1時間20分、冬季が55分～1時間30分であった。採材を行った夏季6頭、冬季6頭分の牛肝臓の全てが健常検体として取り扱われた。

実質における指標菌分布については夏季1頭分が右葉で腸内細菌科菌群及び大腸菌群陽性となり、同数値はそれぞれ40CFU/g及び5CFU/gであった。冬季検体でも1頭分が腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が右葉・左葉共に陽性を示し、それぞれの最大値で 4.1×10^3 CFU/g、 3.8×10^3 CFU/g、 3.6×10^3 CFU/gであった。胆汁からは夏季1頭分を除き、一般細菌数を含む全ての指標菌が不検出であった。実質より腸内細菌科菌群が検出された2頭分の牛肝臓表面からは実質で腸内細菌科菌群陰性であった牛肝臓に比べ、相対的に高い腸内細菌科菌群数を認めた（ 6.8×10^3 CFU/100cm²、 1.9×10^5 CFU/100cm²）。

(x) 自治体 J

自治体 J には本年度より研究協力者として参加いただくこととなった。対象施設では、とたいより肝臓を摘出後、赤物検査用フックにかけ、約5分後に内臓検査場所で

表面ふき取りを実施し、結束バンドで胆嚢管を結紮した。その後、ビニールを敷いたバットに肝臓を受け、保冷剤を入れたクーラーボックスまたは発砲スチロールに入れて検査室に搬入した。同施設における採材から試験開始までの時間は8分から26分であった。なお、同施設における牛肝臓の検査合格率は約70%、当該施設を管轄する自治体管内あるいは隣接自治体管内からの生体搬入率は約90%であった。

採材対象検体数は夏季5頭、冬季5頭とした。このうち、6頭分の牛肝臓実質からは腸内細菌科菌群が検出され、最大値は夏季が65CFU/g、冬季が600CFU/gであった。また、大腸菌群は夏季1頭分、冬季2頭分より検出され、最大値は480CFU/gであった。大腸菌は冬季1頭分で検出され、その最大値は160CFU/gであった。なお、一般細菌は1頭分を除くすべての牛肝臓実質から検出された。以上の指標菌の左・右葉における菌数分布に有意差は認められなかった。

胆汁における指標菌検出成績として、実質左右葉で腸内細菌科菌群が認められた夏季2頭分の胆汁からは同様に腸内細菌科菌群が検出されたが、限局性に実質から同菌が検出された牛肝臓の胆汁は陰性を示した。

3. 腸内細菌科菌群の胆汁及び肝実質における分布の相関性

腸内細菌科菌群が肝実質より検出された個体の各部位での同菌個体別あるいは部位別汚染状況を比較検討するため、図16を作成した。同図に示したように、胆汁検体に同菌の高濃度汚染が認められる個体では、肝実質左右両葉にわたっての同菌汚染を認

めることが明らかとなった。しかしながら、肝実質における本菌の高濃度汚染は胆汁での同菌汚染を可逆性をもって指し示すものとは言い難いことも同時に示された。

4. 異常肝臓における指標菌分布

とたいからの摘出後に何らかの異常を示した計 6 頭分の牛肝臓等については、鋸屑肝、被膜の破損、膿瘍、胆管炎等の診断が下された。これらの指標菌検出成績概要には図 16 に記したとおりである。このうち、肝実質内に膿瘍を認めた 2 頭分の肝臓等については、膿瘍局在部位に腸内細菌科菌群の高い分布を認めたが、胆汁からは不検出であった。同指標菌は衛生指標としての位置づけのみならず、と畜検査における剖検診断の根拠としても有用であると考えられた。一方、鋸屑肝や被膜破損等を示した牛肝臓等については、糞便汚染指標菌の増加を認めなかった。

5. 胆嚢を結紮・除去せずに冷蔵輸送された牛肝臓内部及び胆汁の細菌検出状況

自治体 C 管内の施設で衛生的に採材後、胆嚢を結紮・除去せずに一夜かけて冷蔵輸送した牛肝臓等検体における細菌汚染状況を到着日（解体翌日）に検討した。表 3 に示した通り、計 5 か所から採材した実質右葉での腸内細菌科菌群数は平均 3.8×10^4 CFU/g と、衛生的な採材を行い、胆嚢を結紮または除去後、速やかに供試した検体に比べ、高い値を示した。また、胆汁における同菌数については更に高値を示し、平均値は 1.6×10^6 CFU/mL であった。

D. 考察

本研究では、計 10 自治体の協力を得て、食肉センターでとさつ・解体された直後にとちく検査員（獣医師）の監視指導の下、衛生的に取り出した牛肝臓等を対象として、細菌汚染実態を検討した。

施設別成績として、肝実質から腸内細菌科菌群が検出された検体は計 8 施設で認められた。残り 2 施設（自治体 A 及び C）で採材された検体は異常症例を除き、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌がいずれも陰性を示し、衛生的な採材から検体確保、試験実施等が行われたことが示唆された。

このうち、自治体 C では昨年度肝実質で高い腸内細菌科菌群数を認めたが、本年度は採材から試験までを同自治体担当者の積極的な協力により実施に至った。昨年度と本年度の間で認められた成績の差異の推定要因としては、採材から試験開始までの時間短縮及び検体の安定的な温度管理等が挙げられる。すなわち、牛肝実質の衛生確保においては、採材方法を考慮しつつ、衛生的施設設備環境下で、速やかな加工処理を進めることが実効性を持つ手法として設定できる可能性を示唆するものと考えられる。

この他の昨年度との変更点としては、細切器具の違いが挙げられる。すなわち昨年度、自治体 C（本年度は自治体 F とした）では肝実質細切時に夏季・冬季で異なる細切器具を用いており、これが影響していたためか、両季節間で細菌検出成績が大きく異なっていたことが導入の背景にある。ディスプレイブルタイプのレーザーによる条件の更なる統一化を行ったが、当該自治体の夏季成績は冬季成績に比べ、前年度と同様に高い数値にあった。夏季は、輸送・搬入・繋留時に牛生体が外的ストレス等を受けや

すい状況にあり、とちく前段階における生体側の環境依存性とも思える挙動が細菌検出状況に影響を及ぼしているとも考えられる。

異常を呈する牛肝臓等の検証は各自治体のとちく検査員により実施されている、と畜検査により排除されうるものであるが、牛肝実質等の食品としての安全性確保にあたっては、同マトリックスにおける腸内細菌科菌群等の汚染が極力ないものを選定し、更に応用手法による細菌汚染低減効果を最大限に活用することが有効な手立てと考えられる。仮に生食等に供することを想定する場合には、最終製品において腸内細菌科菌群に係る検証試験を設定することは必要不可欠な事項と考えられるが、製造基準等には簡易に採材できる、胆汁等を用いた腸内細菌科菌群の試験成績を併用することで、微生物学的品質の確保につながるロジックとなりうるものと思われる。

実際に、胆嚢を結紮・除去せずに長時間低温輸送・保存した場合の腸内細菌科菌群数の分布成績は、胆汁が媒体となり腸内細菌科菌群をはじめとする糞便汚染指標菌の実質への拡散を助長することを示唆するものといえよう。肝実質における細菌の拡散・増殖を抑制するための衛生的管理の在り方として、速やかな胆嚢の除去があることはいうまでもないが、同部位のスクリーニング部位としての活用は今後の更なる検討により明らかにされうるものと考えられる。

E. 結論

計 93 頭分の健常牛肝臓等での細菌汚染実態を調査し、以下の知見を得た。

- ・ STEC 及びサルモネラ属菌は全検体で陰性となった。

- ・ 衛生的に摘出・管理した牛肝実質における腸内細菌科菌群の最大菌数は 4.3×10^4 CFU/g であった。

- ・ 採材後の速やかな胆嚢除去及び温度管理が汚染拡大防止に有効であることを示す知見が得られた。

- ・ 肝臓実質より腸内細菌科菌群が検出された個体は 14 頭 (15.1%) であり、うち、実質の左右葉共陽性となった検体では胆汁も陽性となり、高濃度実質汚染検体の探知のための胆汁スクリーニング検査の有用性が示唆された。

- ・ 肝臓実質に異常が認められた個体の胆汁はいずれも腸内細菌科菌群陰性であり、疾病探知にはと畜検査員による検査が重要な意義を有することが改めて示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

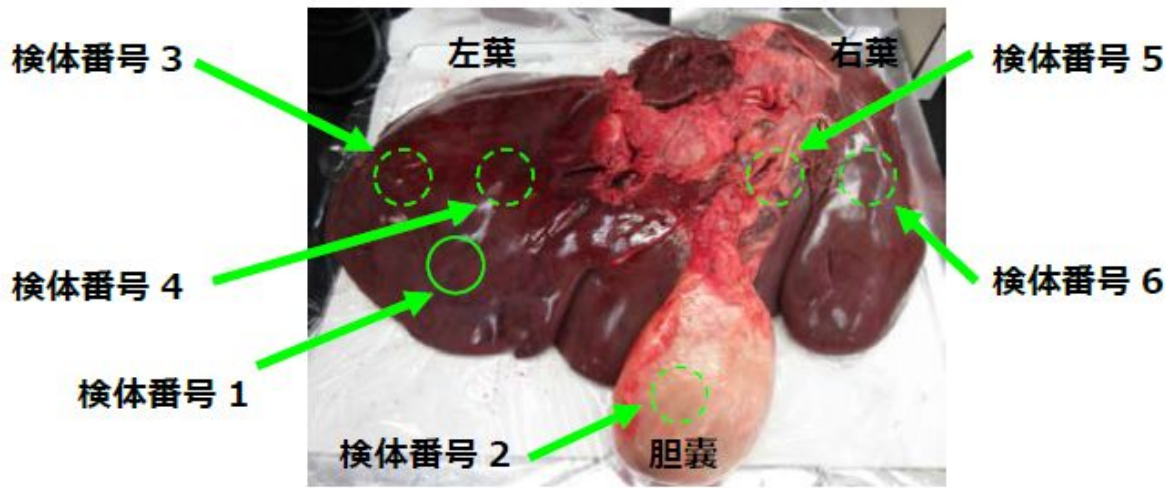


図1. 採材部位

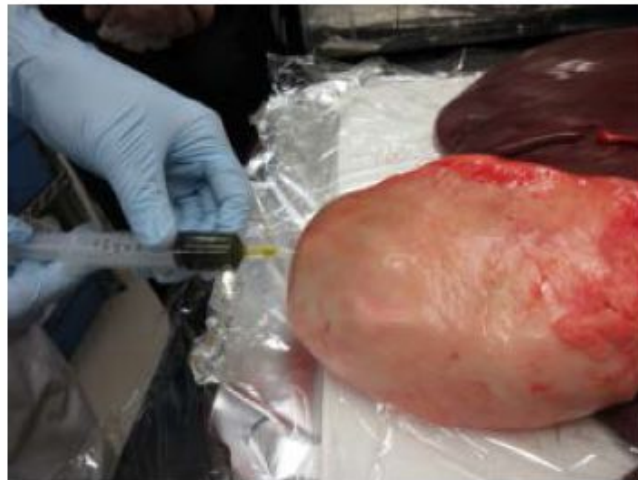
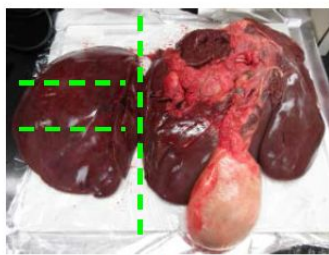
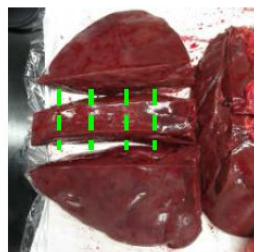


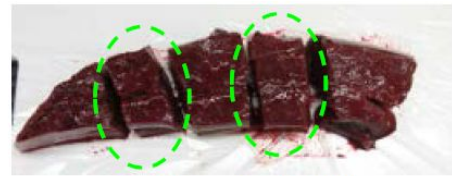
図2. 胆嚢内胆汁の採材



左葉の切り離し



左葉中央の切り出し



検体番号 3、4 の切り分け

図3. 左葉の処理

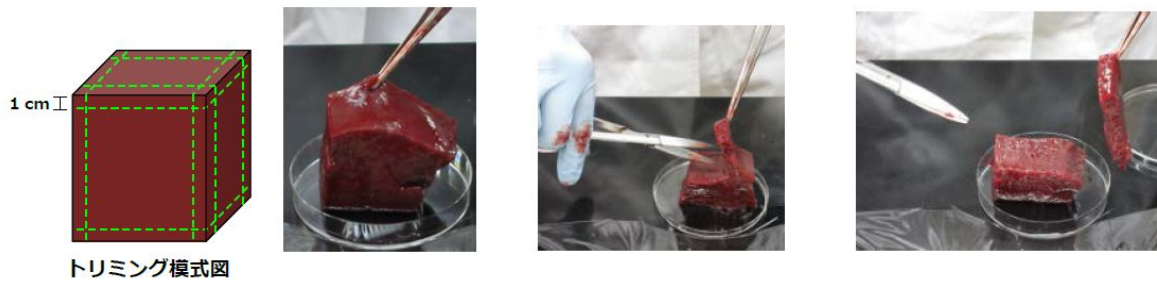
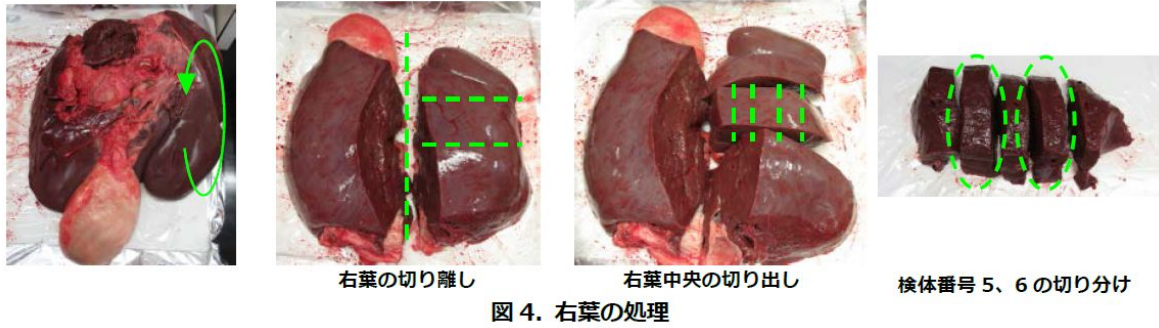


図 6. 自治体 A 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況 .

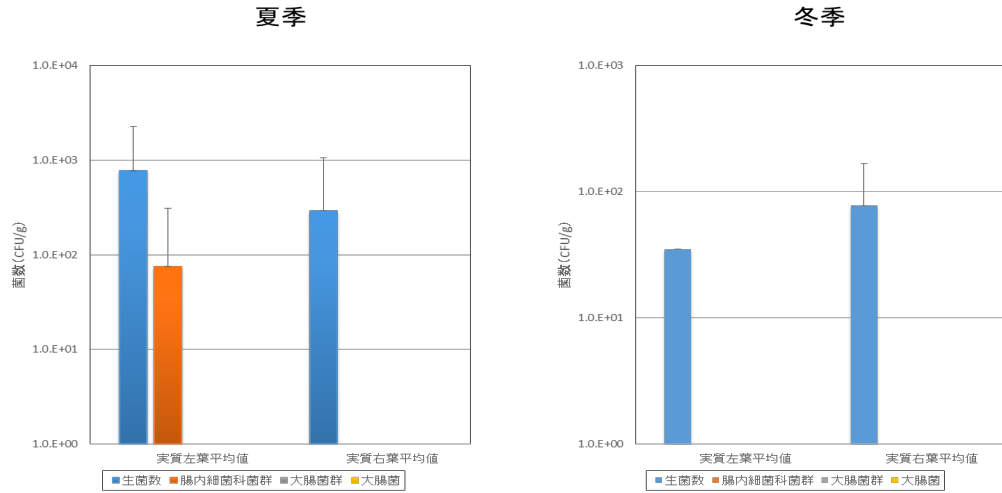


图 7. 自治体 B 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況 .

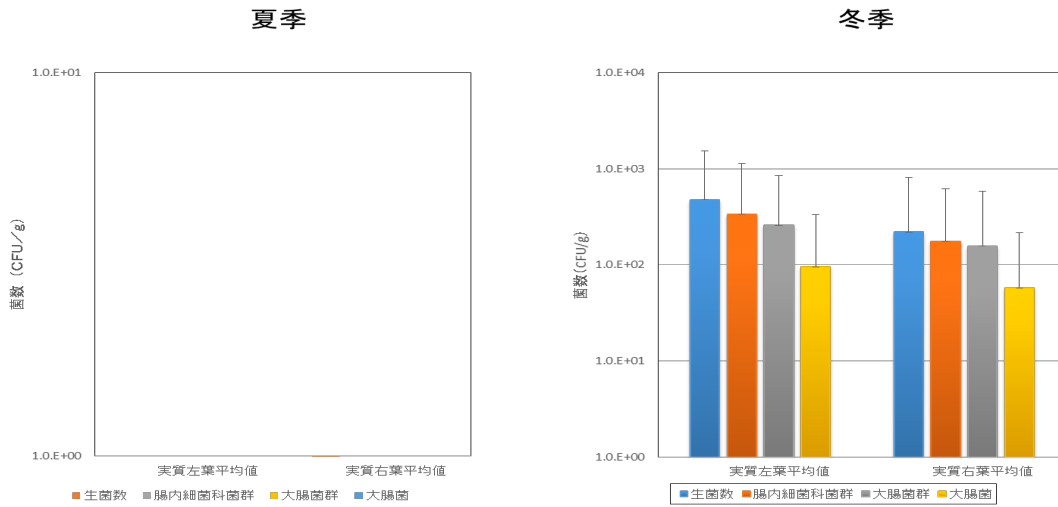


图 8. 自治体 C 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況 .

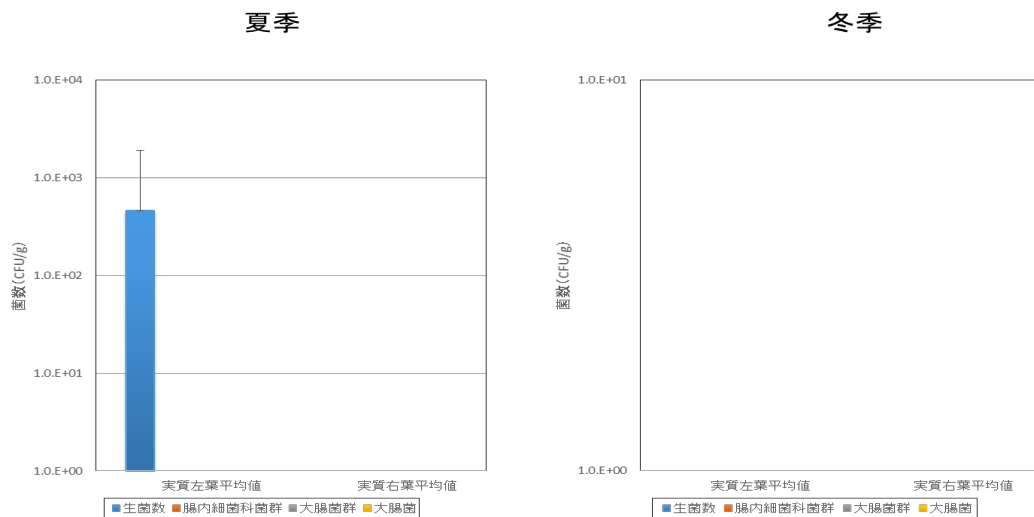


图 9. 自治体 D 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況 .

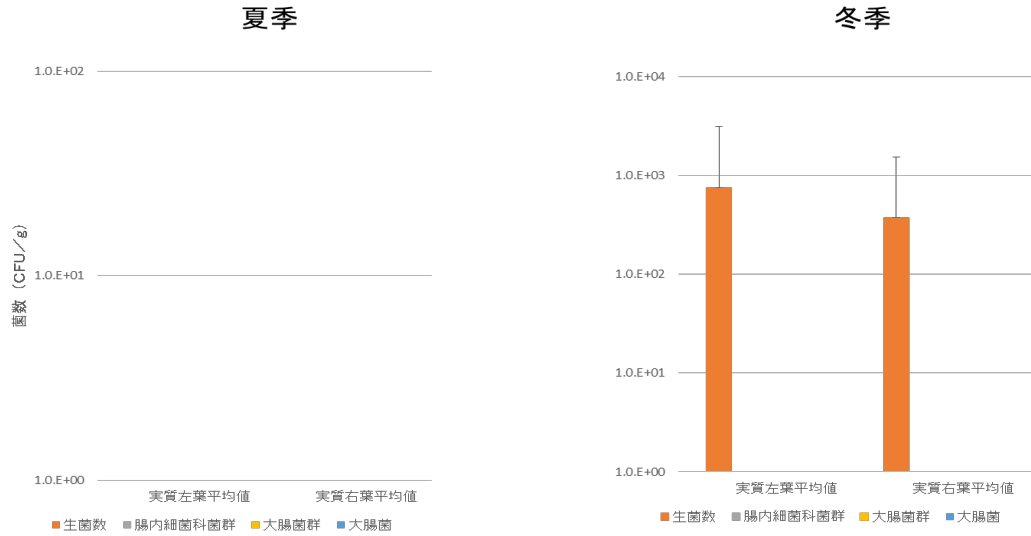


图 10. 自治体 E 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況。

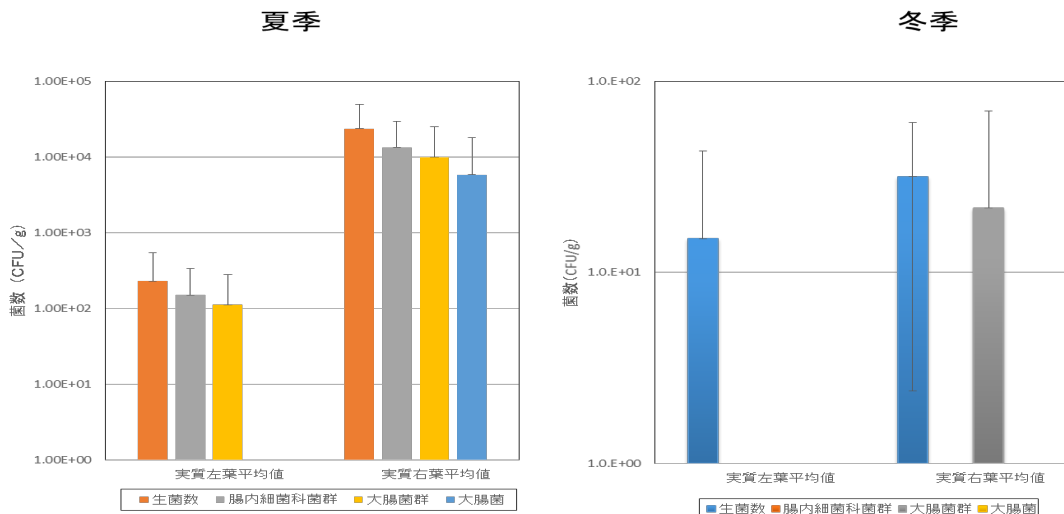


图 11. 自治体 F 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況。

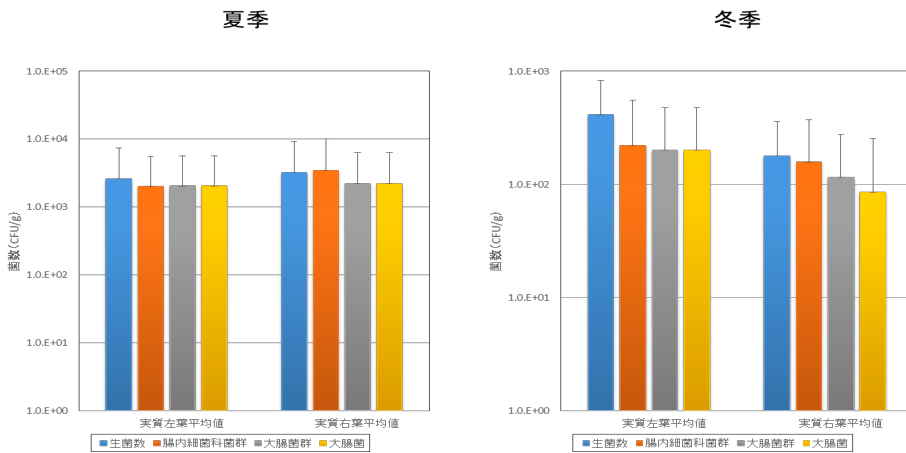


图 12. 自治体 G 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況。

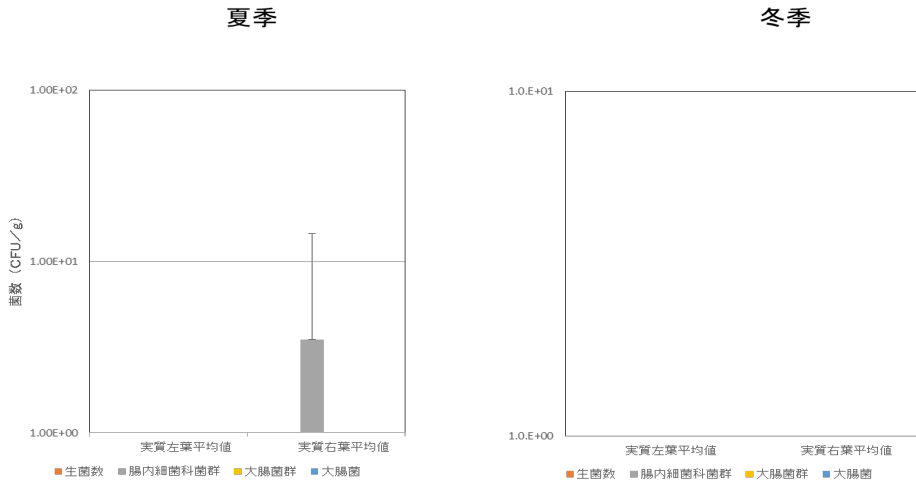


图 13. 自治体 H 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況.

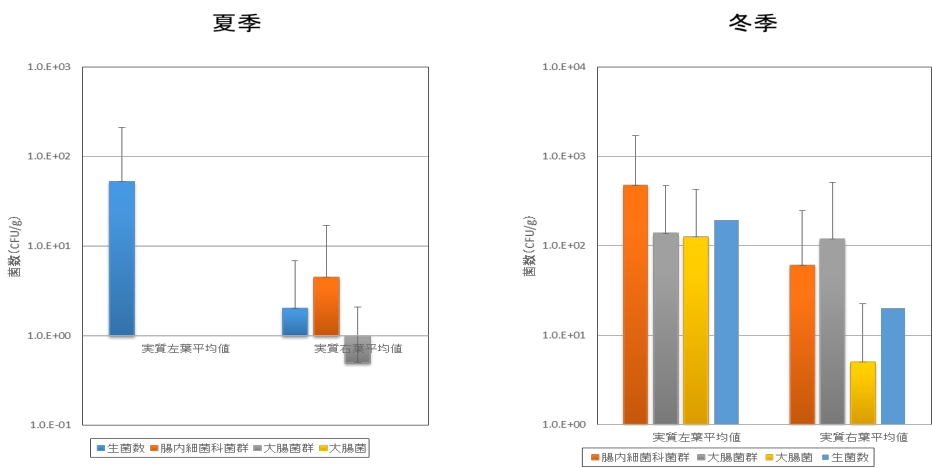


图 14. 自治体 I 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況.

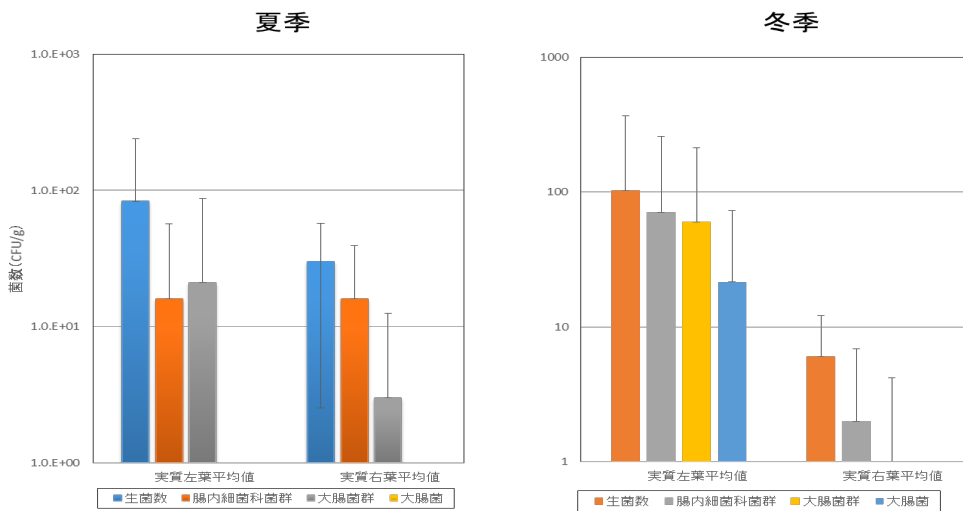
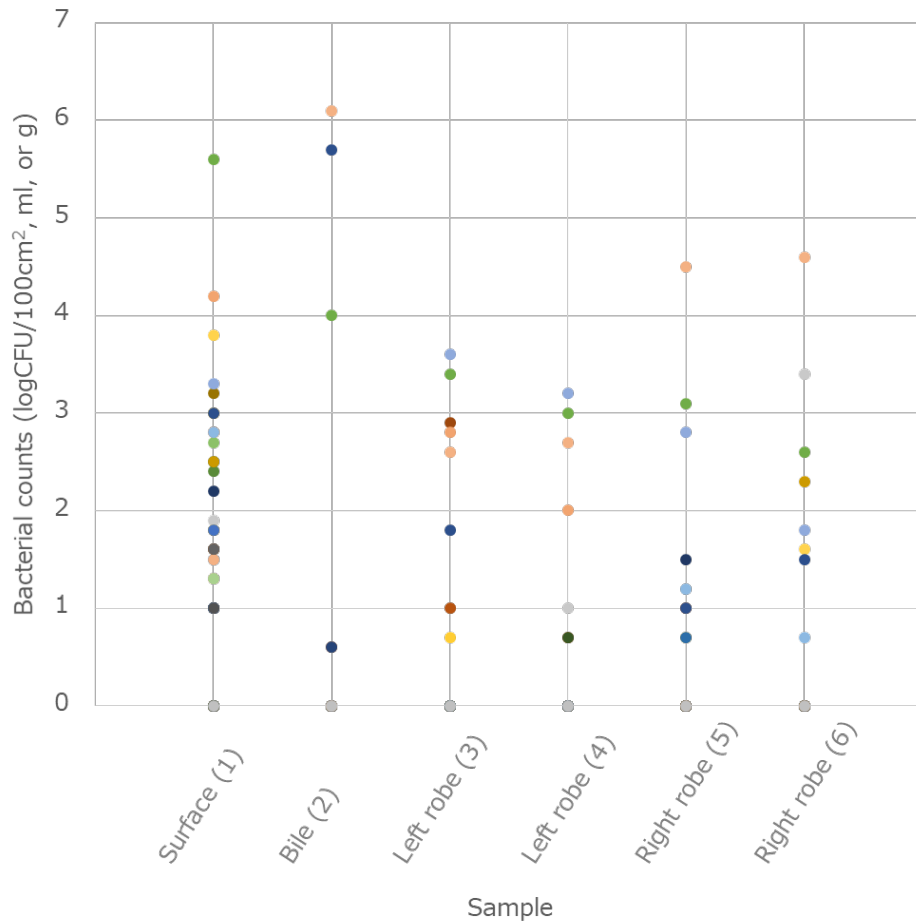


图 15. 自治体 J 由来肝实质検体における季節別指標菌検出状況

A



B

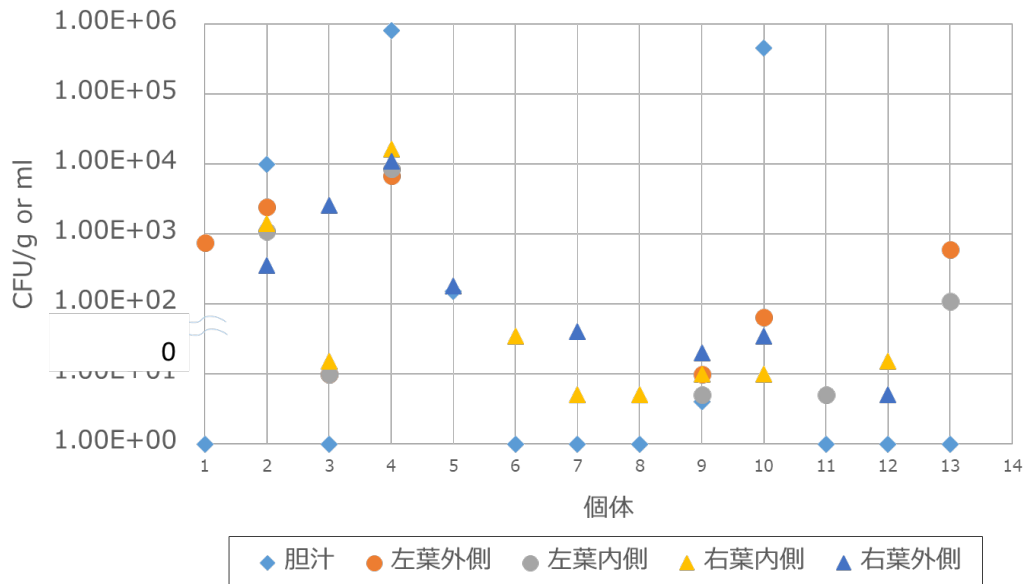


図 16. 健康牛の肝実質・胆汁等における腸内細菌科菌群の分布
 セクション A は部位別の分布動向を指し、採材対象個体ごとに異なる色で示す。セクション B は個体別の分布動向を指し、部位ごとに異なる色で示す。

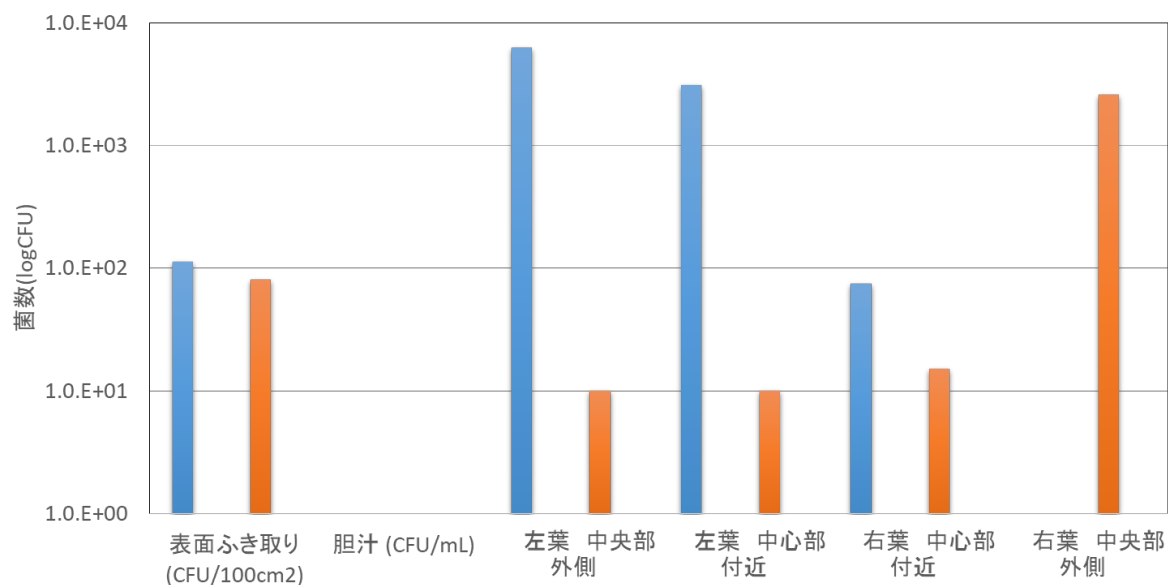


図 17.とちく検査により、異常が認められた牛肝臓等検体における指標菌の部位別検出状況。

青及びオレンジの検体は、自治体 C の夏季検体または自治体 F の夏季検体であり、それぞれ左葉または右葉に膿瘍が認められたものを指す。その他の疾病等の異常を認めた個体由来の検体についても同様に細菌検出試験に供したが、健常個体との明確な差異は認められなかった。

表1 . 供試検体における部位別衛生指標菌の検出状況 (平均値)

部位	指標菌数 (平均値)			
	一般細菌	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌
表面拭取り (CFU/100cm ²)	2.90E+03	3.56E+02	2.58E+02	1.86E+02
胆嚢内胆汁 (CFU/ml)	6.40E+04	1.37E+04	1.12E+04	1.11E+04
実質左葉 外側 (CFU/g)	3.67E+02	1.35E+02	1.20E+02	1.14E+02
実質左葉 内側 (CFU/g)	1.64E+02	1.11E+02	1.11E+02	1.09E+02
実質右葉 外側 (CFU/g)	1.74E+02	1.84E+02	1.10E+02	1.09E+02
実質右葉 内側 (CFU/g)	7.24E+02	1.50E+02	1.04E+02	8.57E+01
実質左葉 (CFU/g)	2.66E+02	1.23E+02	1.15E+02	8.77E+01
実質右葉 (CFU/g)	4.49E+02	1.67E+02	1.08E+02	9.37E+01

表2. 供試検体における施設別衛生指標菌の定量検出状況

一般細菌	自治体A(N=10)		自治体B(N=10)		自治体C(N=8)		自治体D(N=10)		自治体E(N=10)	
部位	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値
表面拭取り(CFU/100cm ²)	10	1.30E+03	7	5.56E+02	8	1.70E+04	10	6.32E+03	10	3.30E+02
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	0	-	1	1.30E+00	1	7.00E-01	3	4.90E+04
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	3	7.70E+02	0	-	5	2.38E+02	1	7.50E+02
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	2	5.00E+00	0	-	4	4.00E+00	1	2.00E+00
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	3	5.95E+01	1	6.30E-01	2	1.50E+00	1	4.00E+00
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	3	2.48E+02	0	-	4	4.50E+00	1	3.70E+02
実質左葉(CFU/g)	0	-	5	3.88E+02	0	-	6	1.21E+02	2	3.80E+02
実質右葉(CFU/g)	0	-	3	1.54E+02	1	3.10E-01	5	3.00E+00	2	1.90E+02

	自治体F(N=6)		自治体G(N=7)		自治体H(N=10)		自治体I(N=12)		自治体J(N=10)	
部位	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値
表面拭取り(CFU/100cm ²)	6	2.58E+02	3	1.46E+02	7	2.73E+02	12	1.40E+03	9	3.20E+03
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	3	5.00E+01	1	1.00E-01	1	8.30E-02	2	4.60E+05
実質左葉 外側(CFU/g)	2	1.25E+01	2	9.71E+01	0	-	2	4.40E+02	5	9.90E+01
実質左葉 内側(CFU/g)	3	1.42E+01	2	3.71E+02	0	-	3	1.30E+02	5	2.30E+01
実質右葉 外側(CFU/g)	4	1.83E+01	2	1.66E+02	0	-	3	6.80E+01	7	8.50E+00
実質右葉 内側(CFU/g)	4	8.18E+03	2	3.71E+01	0	-	3	1.10E+01	7	1.30E+01
実質左葉(CFU/g)	4	1.33E+01	2	2.34E+02	0	-	3	2.80E+02	7	6.10E+01
実質右葉(CFU/g)	5	4.10E+03	2	1.01E+02	0	-	5	4.00E+01	8	1.10E+01

腸内細菌科菌群	自治体A(N=10)		自治体B(N=10)		自治体C(N=8)		自治体D(N=10)		自治体E(N=10)	
部位	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値
表面拭取り(CFU/100cm ²)	4	1.81E+02	3	6.00E+00	6	2.60E+01	9	2.67E+02	3	3.60E+01
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	0	-	0	-	1	4.00E-01	0	-
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	1	7.50E+01	0	-	1	5.00E-01	0	-
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉(CFU/g)	0	-	1	3.75E+01	0	-	1	2.50E-01	0	-
実質右葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

	自治体F(N=6)		自治体G(N=7)		自治体H(N=10)		自治体I(N=12)		自治体J(N=10)	
部位	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値
表面拭取り(CFU/100cm ²)	1	1.33E+01	2	9.70E+01	1	1.70E+01	5	7.30E+02	4	1.90E+03
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	3	5.00E+01	0	-	0	-	2	4.60E+04
実質左葉 外側(CFU/g)	1	1.67E+00	1	5.50E+01	0	-	1	3.40E+02	3	6.70E+01
実質左葉 内側(CFU/g)	1	1.67E+00	1	3.41E+01	0	-	1	1.30E+02	3	1.20E+01
実質右葉 外側(CFU/g)	1	2.50E+00	1	1.10E+01	1	3.50E+00	2	5.50E+01	4	4.00E+00
実質右葉 内側(CFU/g)	1	4.33E+02	2	5.11E+01	0	-	2	9.20E+00	3	6.00E+00
実質左葉(CFU/g)	1	1.67E+00	2	4.40E+01	0	-	1	2.40E+02	3	4.00E+01
実質右葉(CFU/g)	1	2.18E+02	3	3.10E+01	1	1.75E+00	2	3.20E+01	4	5.00E+00

大腸菌群	自治体A(N=10)		自治体B(N=10)		自治体C(N=8)		自治体D(N=10)		自治体E(N=10)	
部位	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値
表面拭取り(CFU/100cm ²)	3	1.22E+02	1	1.00E+00	3	1.10E+01	6	2.09E+02	2	1.30E+01
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

	自治体F(N=6)		自治体G(N=7)		自治体H(N=10)		自治体I(N=12)		自治体J(N=10)	
部位	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値
表面拭取り(CFU/100cm ²)	1	3.33E+00	2	7.10E+01	1	1.20E+01	7	5.70E+02	5	1.30E+03
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	3	5.00E+01	0	-	0	-	1	3.20E+04
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	1	3.90E+01	0	-	1	3.10E+02	2	5.90E+01
実質左葉 内側(CFU/g)	1	4.17E+00	1	4.35E+01	0	-	1	8.30E+01	1	1.20E+01
実質右葉 外側(CFU/g)	1	1.00E+01	1	1.62E+01	0	-	1	5.40E+01	1	1.00E+00
実質右葉 内側(CFU/g)	2	2.43E+02	2	3.45E+01	0	-	2	5.40E+00	1	1.50E+00
実質左葉(CFU/g)	1	2.08E+00	2	2.90E+01	0	-	1	2.00E+02	2	3.50E+01
実質右葉(CFU/g)	3	1.26E+02	3	3.42E+01	0	-	2	3.00E+01	2	1.30E+00

大腸菌	自治体A(N=10)		自治体B(N=10)		自治体C(N=8)		自治体D(N=10)		自治体E(N=10)	
部位	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値
表面拭取り(CFU/100cm ²)	3	1.22E+02	0	-	3	1.10E+01	6	1.89E+02	2	1.20E+01
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質左葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
実質右葉(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

	自治体F(N=6)		自治体G(N=7)		自治体H(N=10)		自治体I(N=12)		自治体J(N=10)	
部位	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値	陽性数	平均値
表面拭取り(CFU/100cm ²)	0	-	0	-	0	-	5	2.60E+02	2	1.10E+03
胆嚢内胆汁(CFU/ml)	0	-	2	4.29E+01	0	-	0	-	1	3.20E+04
実質左葉 外側(CFU/g)	0	-	1	3.93E+01	0	-	1	3.00E+02	1	1.60E+01
実質左葉 内側(CFU/g)	0	-	1	4.29E+01	0	-	1	7.50E+01	1	5.50E+00
実質右葉 外側(CFU/g)	0	-	1	1.57E+01	0	-	1	5.00E+01	0	-
実質右葉 内側(CFU/g)	0	-	0	-	0	-	1	5.00E+00	0	-
実質左葉(CFU/g)	0	-	2	4.11E+01	0	-	1	1.90E+02	1	1.10E+01
実質右葉(CFU/g)	0	-	1	7.86E+00	0	-	1	2.80E+01	0	-

表 3. 胆嚢を結紮・除去せずに一夜冷蔵輸送された牛肝実質（右葉）及び胆汁からの細菌検出状況

検体種別	検体番号	衛生指標菌数 (CFU/g または mL)			
		一般細菌数	腸内細菌科菌群数	大腸菌群数	大腸菌数
牛肝実質 (CFU/g)	1	2.36E+04	2.17E+04	2.02E+04	4.07E+03
	2	5.32E+04	5.47E+04	3.52E+05	5.83E+04
	3	4.22E+04	4.10E+04	4.22E+04	4.09E+04
	4	3.66E+04	3.51E+04	3.38E+04	3.96E+04
	5	3.51E+04	3.50E+04	3.45E+04	3.50E+04
	平均	3.81E+04	3.75E+04	9.65E+04	3.56E+04
	SD	1.08E+04	1.20E+04	1.43E+05	1.97E+04
牛胆汁 (CFU/ml)	6	8.40E+07	1.30E+06	8.70E+05	4.50E+05
	7	6.98E+07	9.75E+05	7.40E+05	2.85E+05
	8	1.19E+08	2.47E+06	1.12E+06	6.12E+05
	平均	9.09E+07	1.58E+06	9.10E+05	4.49E+05
	SD	2.53E+07	7.86E+05	1.93E+05	1.64E+05

牛肝実質（右葉）及び胆汁の菌数はいずれも採材直後の成績に比べ、顕著な増加を示す。

平成 29 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)
「畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究」
分担研究報告

牛肝臓の冷蔵保管中の温度変化と牛胆汁の細菌動態に関する研究

研究分担者	佐々木貴正	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究代表者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

現在、牛肝臓については、生食用としての提供が禁止されている。しかし、生食（レバ刺し）の解禁に対する要望は依然として存在し、その可能性を検討するためには、摘出後の肝臓内部の細菌汚染実態及び保管・流通段階における細菌挙動を解明し、リスクに応じたリスク管理措置を行う必要がある。そこで、摘出直後の肝臓の表面及び内部に温度ロガーを取り付け、と畜場からの出荷（翌日）までの温度変化を計測した。また、肝臓内部の高濃度細菌汚染の実態は、肝臓内部に存在する胆管内の細菌の存在であると考えられており、カンピロバクターや志賀毒素産生大腸菌と同様に、肝臓内部を汚染する可能性が指摘されているサルモネラについて、胆汁中での増殖可能性を検討した。肝臓丸ごとでは、肝臓内部の温度低下はあまり見込めず、5℃まで低下するのに 20 時間を要した。一方、10 cm角にカットした場合には 5 時間で 5℃まで低下した。サルモネラは、ミュラー・ヒントン培地と同程度に胆汁中で増殖した。以上のことから、肝臓摘出後に肝臓丸ごとで保管・流通する場合には、例え、低温かつ低濃度の細菌汚染であっても、肝臓内部の細菌汚染は速やかに拡大すると考えられた。

A. 研究目的

現在、牛肝臓は生食用としての提供が禁止されている。しかし、生食に対する要望は依然として存在し、その可能性を検討するためには、肝臓内部の細菌汚染実態を解明するとともに、摘出後における肝臓内部の細菌挙動を把握し、適切な殺菌及び増殖防止策を行う必要がある。

一般的に、腹腔から摘出された肝臓は、

と畜検査員による検査終了後、内臓取扱業者に渡り、胆嚢を切除後、一定時間（半日～翌日）冷蔵庫で保管された後、と畜場から出荷される。この間、肝臓に病変等が見られないものについては、肝臓丸ごとのまま冷蔵保管されることが多い。摘出直後の肝臓の温度は約 40℃であるが、重量約 6kg、厚み約 10 cmもあるため、丸ごと冷蔵室に入れても、肝臓内部の温度

を急激に下げることが困難であり、細菌が増殖している可能性は高いと考えられるものの具体的なデータがないのが現状である。

そこで、今回、1内臓取扱業者の協力の下、摘出直後の肝臓の表面及び内部に温度ロガーを取り付け、と畜場からの出荷（翌日）までの温度変化を計測した。また、肝臓内部における細菌の高濃度汚染は、胆嚢内胆汁の細菌汚染と関連性が高いこと、さらに、志賀毒素産生大腸菌やカンピロバクターは胆汁で増殖できることが知られており、肝臓内部の高濃度細菌汚染の実態は、肝臓内部に存在する胆管内の細菌の存在であると考えられている。そこで、カンピロバクターや志賀毒素産生大腸菌と同様に、肝臓内部を汚染する可能性が指摘されているサルモネラについて、胆汁中での増殖可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 材料（肝臓及び胆汁）

1と畜場でと殺・解体された黒毛和種又は交雑種の肝臓及び胆嚢内胆汁。当該と畜場では、肝臓摘出後、と畜検査員によると畜検査後に、フックに掛けられ、内臓取扱業者の加工室に運ばれる。そこで、洗浄されたステンレス製作業台に置かれ、胆嚢切除後に次亜塩素酸水で表面を洗浄後、ビニール袋に入れられ、氷水中に約10分間浸漬される。その後、プラスチック製のトレイに他の臓器（心臓、尾、舌などの赤物と呼ばれる臓器）ともに入れられ、冷蔵室（設定値4℃）で翌日まで保管される。その後、翌日午前に加

工販売業者に運ばれる。胆汁の採取については、肝臓から切除された胆嚢を作業員から受け取り、その場で、19G注射針を取り付けた50mLシリンジを用いて胆汁を約50mL採取した。なお、注射針を突刺する部位はアル綿で予め消毒した。採取した胆汁は保冷剤を入れたクーラーボックスに入れ、当研究所に持ち帰り、3時間以内に試験に供した。

2. 肝臓の表面及び内部の温度変化

上述のビニール袋に肝臓を入れる際に、左葉の中央の表面（漿膜下）及び深さ4cmの部分に温度ロガー（おんどとり）を取り付け、翌日の出荷までの間の温度を経時的に計測した（丸ごとの場合）。また、出荷時の肝臓を当研究所に持ち帰り、10cm角の大きさに切断し、ウォーターバスで39℃まで温めたのち、深さ4cmの部分に同様に温度ロガーを取り付けて温度変化を計測した。

3. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群濃度

胆汁を、PBSを用いて10倍段階希釈し、3M社製のペトリフィルム（EBプレート）を、各濃度2枚を用いて計測した。

4. 胆汁中におけるサルモネラ増殖

採取した各胆汁100μLについて、ミュラー・ヒントン寒天培地、GAM培地に塗抹し、37℃で好気培養及び嫌気培養、さらに、各100μLをmCCDAに塗抹し、30℃及び42℃で微好気培養を行い、すべての培地で菌の発育が認められなかった胆汁を使用した。

これら胆汁に、ミュラー・ヒント

ン寒天培地又はミューラー・ヒントン液体培地で1夜培養(37)したサルモネラ株(LT2株)を終濃度約2~3 log cfu/mLとなるように胆汁に懸濁し、20、30及び38で5時間まで培養した。なお、対照としてミューラー・ヒントン液体培地でも培養した(38のみ)。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 結果

1. 肝臓表面及び内部の温度変化

摘出直後の肝臓の温度は表面内部ともに39前後あるが、氷水中に10分間浸漬することで表面は20前後まで低下がみられた。しかし、氷水から取り出すと急速に約25まで上昇し、その後は、内部の温度変化と同様に徐々に低下していった。この変化は、3検体のすべてで同じ傾向であり、内部の温度が5となったのは、約20時間後であった。一方、10 cm角にした場合には、2時間で20以下、5時間で5にまで低下した。(図1)

2. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群濃度

胆汁41検体中5検体(12%)から腸内細菌科菌群が分離され、その濃度は、6.4~7.4 log cfu/mLと高濃度であった。供試された牛は、7都道府県に所在する農場から出荷されていたが、腸内細菌科菌群の有無と、牛

個体の出荷地域、性別、去勢の有無との間に関連性は見られなかった(表1)。

3. 胆汁中におけるサルモネラ増殖

ミューラー・ヒントン寒天培地で発育させたサルモネラを添加した場合でも、ミューラー・ヒントン培地で発育させたサルモネラを添加した場合でも、胆汁とミューラー・ヒントン培地における増殖曲線は同じであった(38)。一方、20で培養すると、5時間後も菌数増加は10倍未満であった(図2及び3)。

D. まとめ

現在、多くの内臓取扱業者では、摘出後の肝臓を丸ごと冷蔵室に保管しているが、丸ごとでは、内部温度を急激に下げることができず、肝臓内部に細菌汚染があった場合、20以下に下がるまでの間に汚染細菌が増殖してしまう可能性が高いことが判明した。また、当該施設では、氷水中に10分間浸漬しているが、それも表面温度を一時的に下げることしかできないことが判明した。

今回の調査でも、1割強では胆汁に高濃度(6.4 log cfu/mL以上)の腸内細菌科菌群の汚染が認められ、これら腸内細菌科菌群によって肝臓内部が汚染されていると考えられる。

以上のことから、生食用として牛肝臓を提供するためには、原料となる牛肝臓内部の細菌汚染状態を摘出直後から悪化させないようにする必要があり、摘出後は丸ごとではなく、なるべく早く、カットし、急冷する必要があると考えられた。

今後は、カットの大きさ及び適切な急冷方法について検討を行う必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 1：肝臓内部の温度変化

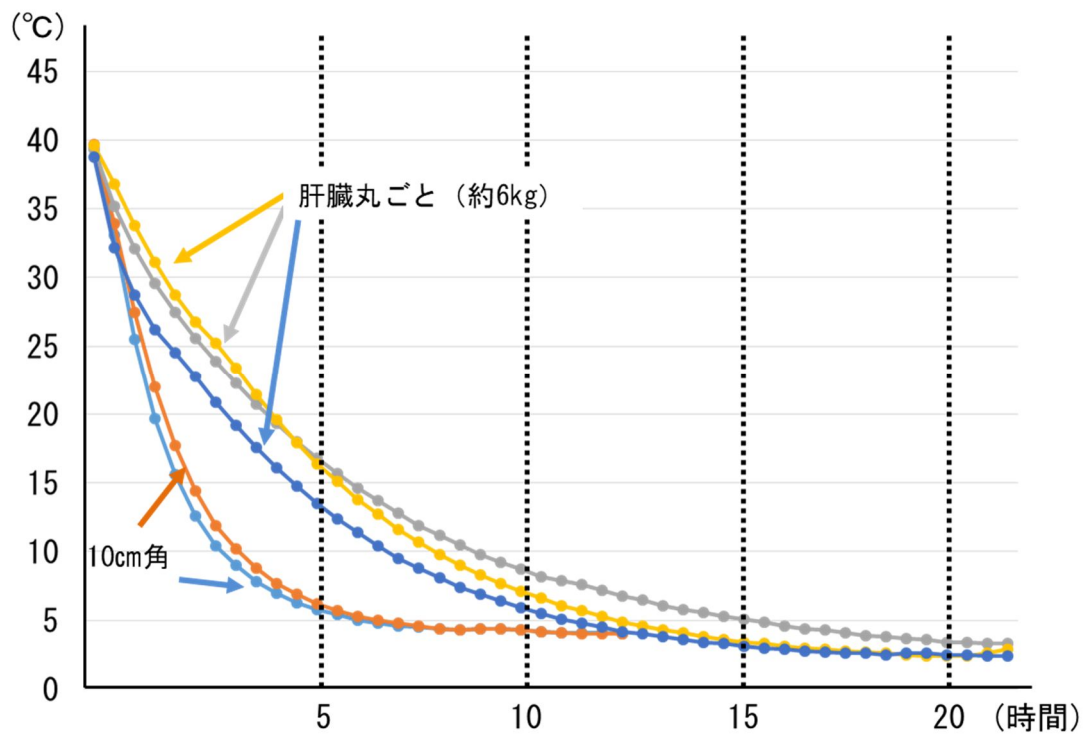


表 1：胆汁から腸内細菌科菌群が分離された個体情報

検体番号	出荷都道府県	品種	性別等	生年月日	腸内細菌科菌群 (cfu/mL)
8	北海道	黒毛和種	去勢	2015/6/11	2.5×10^6
11	群馬	黒毛和種	去勢	2015/5/23	7.9×10^6
17	北海道	交雑種	去勢	2015/2/4	1.4×10^7
19	岩手	黒毛和種	去勢	2015/7/30	2.6×10^7
29	北海道	黒毛和種	雌	2015/3/28	3.6×10^6

図 2：胆汁中におけるサルモネラ（*S.Typhimurium* LT2）の増殖能（ミュラー・ヒントンス寒天培地で前培養）

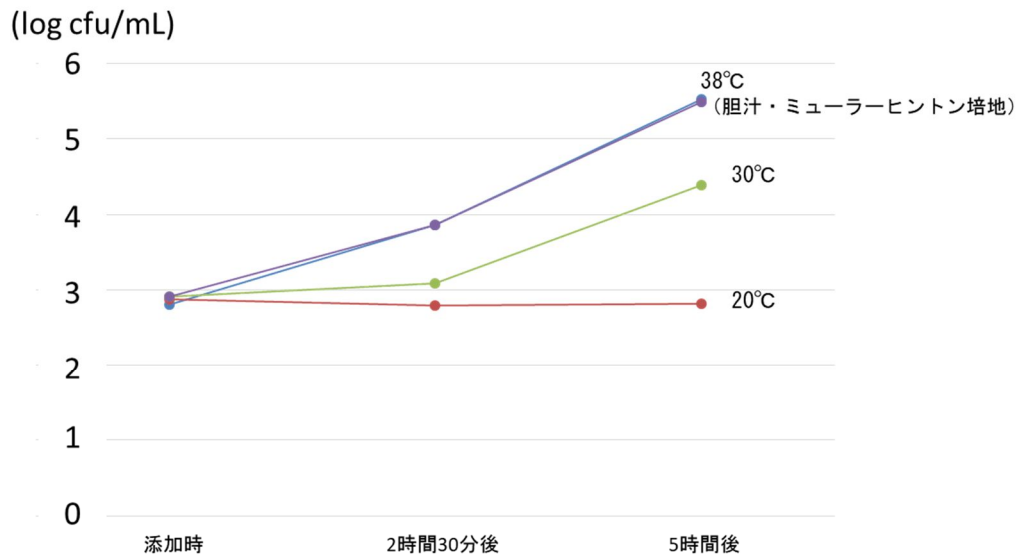
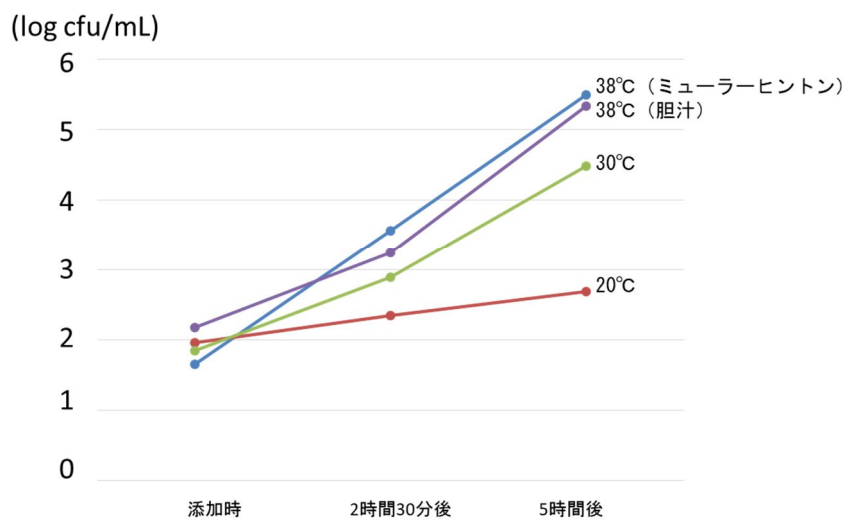


図 3：胆汁中におけるサルモネラの増殖能（ミュラー・ヒントン液体培地で前培養）



平成 29 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の生物学的ハザードとその低減手法に関する研究 (H28-食品-一般-005)

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 食品総合研究部門

研究協力者：川崎 晋 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究部門

研究協力者：清藤 一 国立研究開発法人 量研機構 高崎量子応用研究所

研究要旨： 牛肝臓に $10^5 \sim 10^7$ CFU/g の *Escherichia coli* O157 DT66 株もしくは *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を接種し、4.0～8.1、8.0～12.3 kGy の範囲のガンマ線を照射した場合での生残試験を行った。昨年度までの研究で得た生残曲線に予測信頼区間を設け、その予測信頼区間上限の結果から、*E. coli* O157 の場合は、5.3～5.5 kGy、*S. Enteritidis* の場合 8.2～8.5 kGy の照射により 95% から 99% の信頼度で 10^5 CFU/g を低減させることが可能であると考えられ、ガンマ線による照射試験の結果はその予測を反映していた。

A. 研究目的

近年、食習慣の変化や高齢化などの社会状況の変化を反映し、わが国における細菌性あるいはウイルス性の食中毒の発生状況に変化が生じている。2011 年にはユッケを原因食材とする腸管出血性大腸菌による集団食中毒が発生し、それを契機に畜産物の生食による食中毒リスクが議論された。特に、牛肝臓については、薬事・食品衛生審議会において、牛肝臓の内部が腸管出血性大腸菌により汚染される可能性があるとともに、それらを除去する手法が見いだせないことから、牛肝臓を生食用として販売することを禁止する規格基準を設定された。

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

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

本分担研究課題では、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確立することを目的とする。これまでの研究において *E. coli* O157 ならびに *S. Enteritidis* の牛肝臓中での線照射に対する生残曲線について検討してきており、既

知の線照射量でどのくらいの殺菌効果が認められるかを推定可能とした。

本研究では、仮に *E. coli* O157 ならびに *S. Enteritidis* が高濃度汚染として牛肝臓内に存在した場合、推定されたガンマ線量で低減化が可能となるのか、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、屠殺直後に凍結した牛肝臓塊(約 5.3 kg)を用いた。これらは購入後、-80 で保存した。試料は 25 g の塊となるよう無菌的に切り分け、各々ガスバリア性の袋に移した後、-80 で冷凍保存した。

2. 供試菌株

供試菌は、*E. coli* O157 DT66 株ならびに *S. Enteritidis* IFO3313 株を用いた。

供試菌を Trypticase Soy Broth(TSB; Difco)にて 35 一昼夜静置培養した後、遠心分離(4000 x g, 10 分間)により菌体を収集、培地成分を除去した。おのおの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 10^9 CFU/mL となるように調整、これを供試菌液として以降の試験に用いた。

3. ガンマ線照射と線量分布確認

ガンマ線照射は、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構、高崎量子応用研究所(量研、高崎研)のガンマ線照射施設を用いて行った。照射時の温度は、冷凍(ドライアイス下: -80)とし、照射中の温度を一定に保つため、肝臓試料の背面にドライアイス当て、全体を発泡スチロールの容器に入れ、前面から照射を行った。照射時

間の半分で肝臓試料を裏返し、両面照射を行った。線量率は約 2.5 kGy/h であった。

毎時の吸収線量の確認は、照射試料の外箱の基準位置にアラニン線量計(アミノグレイ、日立電線株式会社)取り付け、量研、高崎研が校正した検量線を用いた線量測定システムにより行った。このシステムにおける線量測定の不確かさは 3% である。

吸収線量の分布は、殺菌試験に用いたものと同型の肝臓試料を模擬試料とし、試料内部と表面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)とともに、常温照射を行った。照射後アラニンペレットの信号を ESR 装置(Bruker EMX-Plus)で測定して決定した。検量線は英国の National Physical Laboratory の標準アラニンペレットで作成した。

4. 牛肝臓のガンマ線殺菌効果確認試験

菌体の接種は、自然解凍後した 25 g 塊の牛肝臓あるいは牛挽肉の内部に、供試菌液 100 μ L を注射針により注入することで行った。菌体濃度は終濃度で、 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g 程度となるように調製した。菌体接種後の試料は、直ちに、ガスバリア袋(PTS 袋; 三菱ガス化学製、PB180250P 90 x 120mm)を用いて脱気包装を行った。包装後の検体は、-80 の冷凍庫内で 2 時間以上放置して温度を一定にした後、ガンマ線照射(目標線量 4 ~ 12 kGy)で照射した。

5. 標的微生物の検出

ガンマ線照射後の検体に滅菌緩衝ペプトン水を加えて 10 倍乳剤とした後、35 で一昼夜培養した。培養した菌液は標準寒天

平板および VRBG 平板 (Oxoid) に一白金耳を各線し、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 *E. coli* O157 および *Salmonella* 同定キット (Singlepath *E. coli* O157; Merck Singlepath *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *E. coli* O157 もしくは *Salmonella* 属であることを確認した。

C. 研究結果および考察

1. 照射試料の配置と線量分布

牛肝臓試料 (25 g, 厚さ約 14mm) の中心に、アラニンペレットを封入し、ガスバリア袋で包装後、発泡スチロール容器 (外径 (436 mm(横) × 276 mm(縦) × 136 mm(奥行き))、内径 (400 mm(横) × 240 mm(縦) × 100 mm(奥行き)) の蓋の裏側に密着するように 2 段に 5 個ずつ計 10 個配置し、背面からドライアイス当てることを想定してクッションで押さえた (図 1)。この模擬試料入れた 3 つの試料箱 ~ それぞれを、肝臓試料の距離方向の中心位置を、図 2 上に示すように、照射室内の線量率の基準線とあわせ、試料箱の高さ方向の中心位置はコバルト線源の中心位置 (22.5 cm) に合わせて設置した。この模擬資料について約 10 kGy の照射を行った。その際、均等な照射を行うため、照射時間の半分の時間で、同位置において肝臓試料の前後を 180 度回転させ、両面から照射を行った。

図 2 下段に、各試料箱中に配置した、各資料箱中の 10 個の試料の中心部および試料表面の線量測定の結果を示す。試料中心および両表面に取りつけた線量計の吸収線

量はほぼ等しく、肝臓試料の厚さ方向を中心反転させる両面照射で、いずれの肝臓試料 (25 g) においても、ほぼ均一な線量分布が得られていることが確認された。

照射室の両脇に配置した箱 および箱では、肝臓試料中心の線量は、9.8~12.3 kGy と広範な分布となった。これは、照射室内の線量分布ライン(曲線)と箱内試料の試料位置(直線)が合わず、同一線量分布の曲線より、線源に近い部分の線量が高くなったためである。

線源正面に配置した試料箱 における 10 個の肝臓試料の中心部および表面も含めた全体の分布は、9.65~10.2 kGy の範囲であり、箱内での線量分布の最大/最小線量比は 1.06 と得られた。また、箱外側の基準位置で測定した線量は、9.88 kGy であり、これを 1 とすると、肝臓試料の線量比は 0.977~1.03 となり、箱 の設置位置での照射は、十分に均一な線量分布が確保出来るものと判断し、以降、基本的にこの設置位置を使って両面照射による微生物試験を行った。

2. 牛肝臓中における *E. coli* O157 ならびに *Salmonella* のガンマ線による殺菌効果

牛肝臓に接種した $10^4 \sim 10^7$ CFU/g の *E. coli* O157 ならびに $10^5 \sim 10^7$ CFU/g の *Salmonella* をドライアイス下、脱気包装条件において規定の線量で死滅が可能を検討した。図 3, 4 に *E. coli* O157 および *Salmonella* の線照射による推定死滅曲線と、その 95% および 99% 予測信頼区間を示した。すなわちこの信頼区間以上の条件で線を曝露すると、その信頼度で低減可能であると予想された。これを確認するため、*E. coli*

O157 ならびに *Salmonella* の菌液を 10^{5-7} CFU/g の濃度となるよう接種した牛肝臓について、様々な線量で曝露した際の検出結果を同図上に示した。

図 3 に *E. coli* O157 の検出結果を示した。予想通り、95%信頼区間内では生残する検体が確認され、この区間内では死滅と生存の境目にあると考えられた。また、95%信頼区間外の高い線量曝露域では全ての検体で不検出となった。図 4 では *Salmonella* についての検出結果を示した。ここでは、前項の箱の設置位置で接種菌数と線量を変えた 5 検体の判定結果に加え、箱

の位置に 2×10^5 または、 2×10^7 CFU/g の *Salmonella* を接種した際の 1 検体ごとの検出結果を合わせてプロットしている。*Salmonella* においても同様に 95%信頼区間内では生残する検体が確認され、99%信頼区間外の高い線量曝露域では全ての検体で不検出となった。

仮に 10^5 CFU/g の *Salmonella* を 95%および 99%予測信頼区間で低減するのであれば、8.2~8.5 kGy の照射により達成が可能であり、この現象を接種回収試験により確認できた。

このようにこれまでの研究成果にて得られた生残曲線に 95%および 99%予測信頼区間を設け、その結果を基にガンマ線曝露線量を決定することが妥当と考えられた。

3. 自然汚染試料におけるガンマ線照射予備試験

非接種区においてもガンマ線の菌数低減効果を確認するため、その予備的検討を行った。1 頭分の牛肝臓から切り分けた 5 個の非接種検体について、ドライアイス下脱

気包装にて 7 kGy 照射し、1 晩増菌後に、標準寒天平板および VRBG 平板で検出した結果は、すべて陰性であった。なお、この肝臓の照射前の微生物試験結果は、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数について、それぞれ、 3.8×10^4 、 3.8×10^4 、 9.7×10^4 、 3.6×10^4 CFU/g、であった。今後、さらに、自然汚染試料についての殺菌効果の確認を行うとともに、流通を念頭においた試料の形体における商業照射施設での照射における線量分布の検証が必要である。

D. 結論

牛肝臓に $10^5 \sim 10^7$ CFU/g の *Escherichia coli* O157 DT66 株もしくは *Salmonella* Enteritidis IFO3313 株を接種し、4.0~8.1、8.0~12.3 kGy の範囲のガンマ線を照射し、死滅するか否かの確認を行った。昨年度までの研究で得た生残曲線に予測信頼区間を設け、その予測信頼区間上限の結果から、*E. coli* O157 の場合は、5.3~5.5 kGy、*S. Enteritidis* の場合 8.2~8.5 kGy の照射により 95%から 99%の信頼度で 10^5 CFU/g を死滅させることが可能であると考えられ、ガンマ線による曝露試験の結果はその予測を反映していた。

E. 文献

- 1) 厚生労働省、薬事・食品衛生審議会、食品衛生分科会 2012 年 6 月 12 日、<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002fsbi.html>
- 2) 厚生労働省：生食用食肉の腸内細菌科菌群の試験法について、食安発 0926 第 1 号 平成 23 年 9 月 26 日

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1)川崎晋、齋藤美枝、持田麻里、等々力節子、牛肝臓内部における *Campylobacter jejuni* の線照射による殺菌効果, 日本食品科学工学会誌、印刷中

講演・研修会等

なし

H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

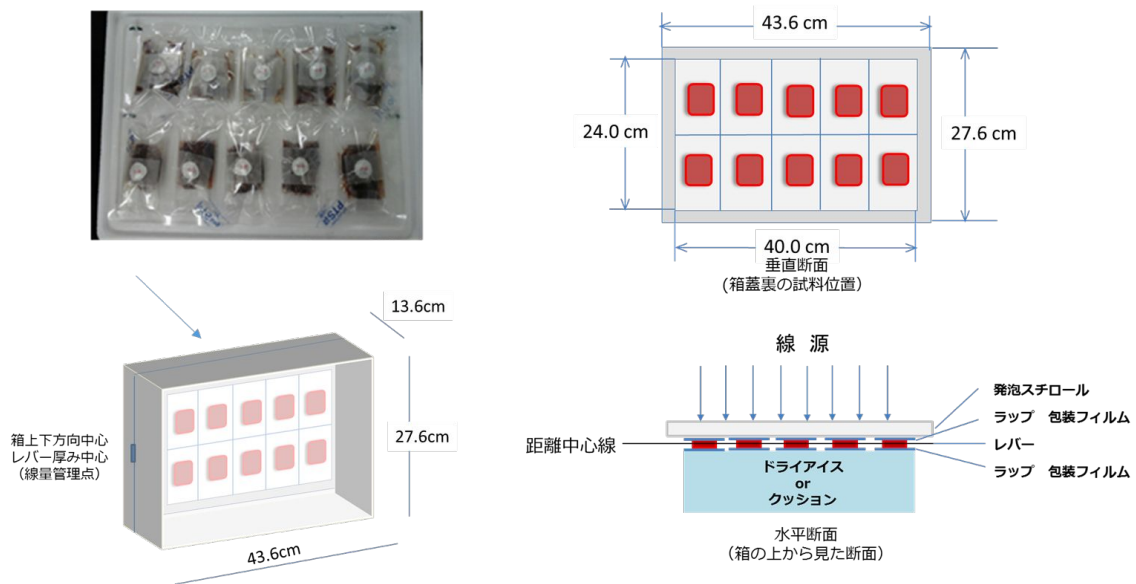
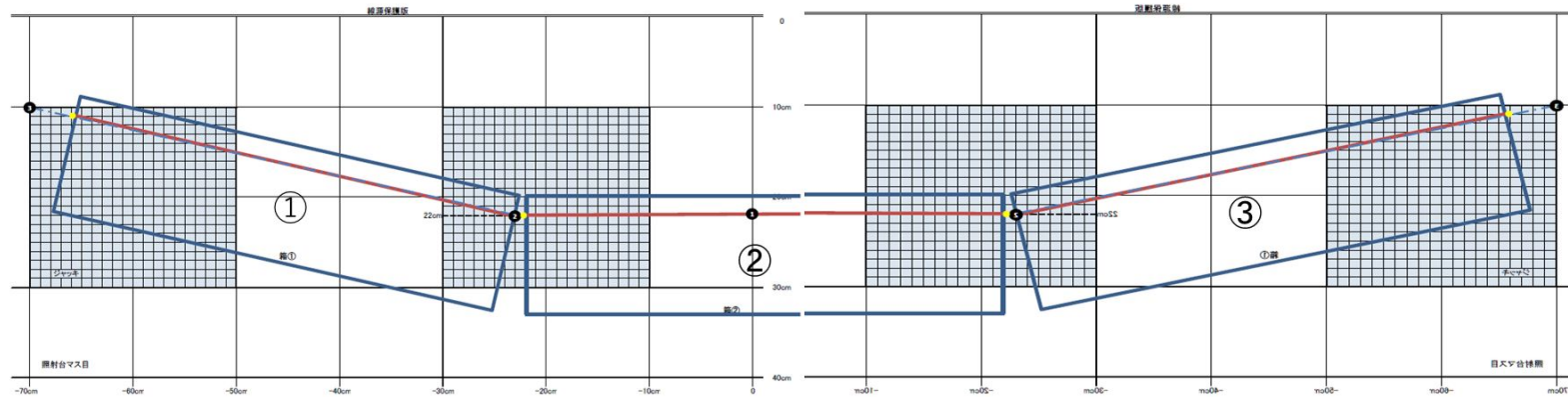


図 1. 発泡スチロール容器に貼り付けたレバー試料(写真)と箱内での模式図

奥行き（深さ）10cm の箱の空隙には、模擬試料照射時（室温）ではクッション材を試料照射時（冷凍）条件では、ドライアイスを含めた。

レバー中心と表面には、密封したアラニンペレット線量計を装着
試料中心の位置を線源からの距離の基準位置に合わせた。

線 源



箱①

位置番号					
表面	12.5	12.4	11.9	11.2	10.5
中心	12.1	12.1	11.4	10.8	10.4
表面	12.4	12.3	11.7	11.0	10.6
位置番号					
表面	11.7	12.0	11.3	10.8	10.2
中心	11.4	11.7	11.3	10.8	10.2
表面	11.7	11.7	11.4	10.9	10.2

箱

位置番号					
表面	10.1	10.2	10.1	10.1	10.2
中心	10.0	9.95	9.88	10.0	10.1
表面	10.1	10.1	10.0	10.2	10.1
位置番号					
表面	9.78	9.87	9.94	9.91	9.97
中心	9.65	9.78	9.78	9.71	9.93
表面	9.85	9.84	9.97	9.80	9.98

箱

位置番号					
表面	10.5	11.1	11.9	12.6	12.8
中心	10.5	10.8	11.7	12.2	12.3
表面	10.4	11.0	11.7	12.6	12.7
位置番号					
表面	10.1	10.5	11.3	11.7	12.1
中心	9.80	10.3	11.0	11.6	11.8
表面	10.1	10.4	11.2	11.7	12.1

図2. 試料箱 ~ の設置位置と試料箱内に配置した肝臓試料(10個)の中心および表面での吸収線量

箱 の外箱に取りつけた基準位置の線量計の吸収線量は 9.88 kGy これを 1 とすると箱内の肝臓試料の線量比は 0.977 ~ 1.03 の範囲。

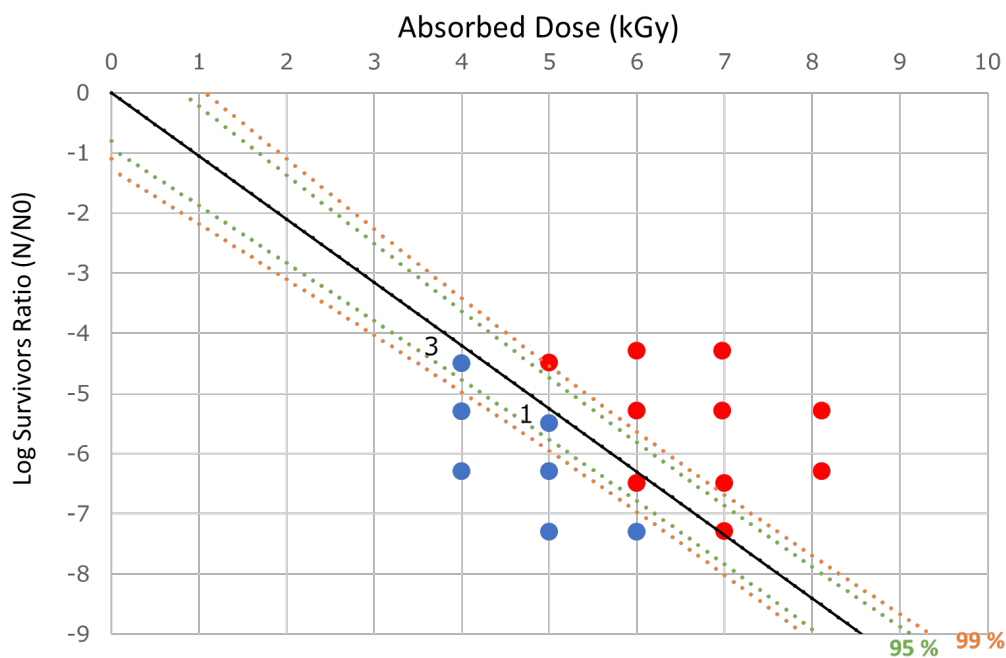


図3. *E. coli* 0157 の推定死滅曲線およびその95% (...) , 99% (...) 予測信頼区間と、実際の接種試験区での生残判定結果.

... 95%, ... 99%予測信頼区間

供試5検体中のすべてから検出されず

供試5検体中、生残検体有り。添え数字は生残検体数、無記載は5検体生残

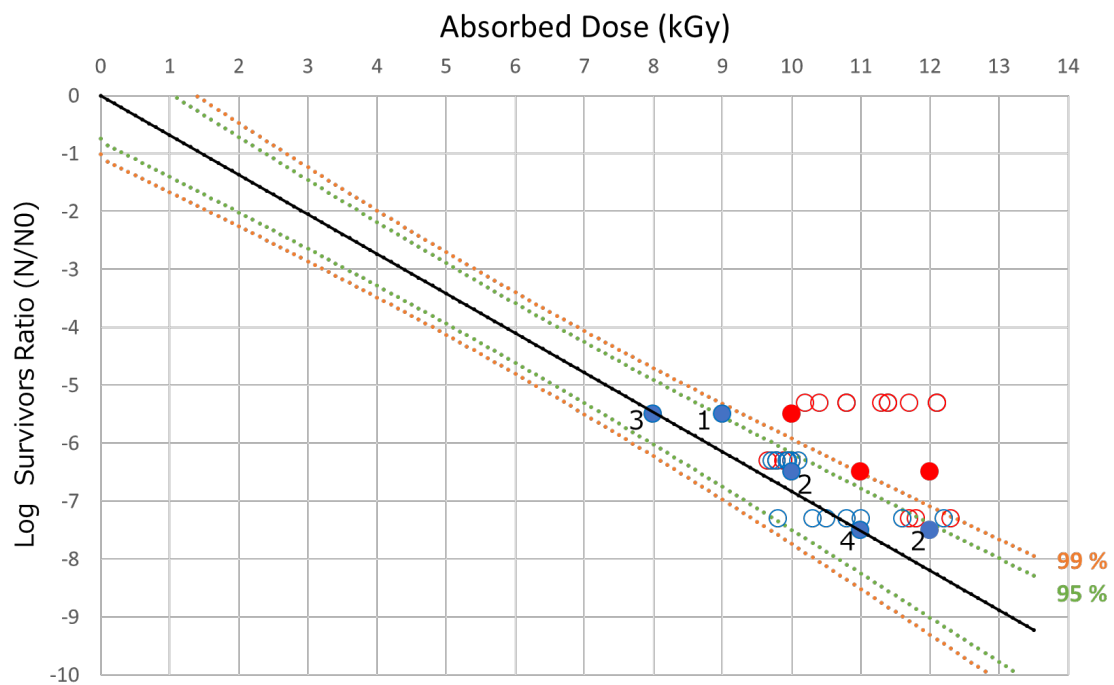


図 4. *Salmonella* の推定死滅曲線および 95%, 99% 予測信頼区間による死滅曲線と、実際の接種区での生残判定結果.

..... 95%, 99% 予測信頼区間

供試 5 検体中のすべてから検出されず (設置位置)

供試 5 検体中生残有り。添え数字は生残検体数 (設置位置)

不検出 (1 検体ごとの判定)

生残 (1 検体ごとの判定)

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 茨城大学農学部

研究協力者 百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：牛肝臓の生食については、致命率の高い食中毒を引き起こす腸管出血性大腸菌等の感染リスクが高いことから、安全に提供できる知見が得られるまでの間として、平成 24 年 7 月から生食用の提供が禁止された。本研究では、非加熱殺菌法のひとつである高圧殺菌法を用いて、牛肝臓中の食中毒原因菌の低減手法について検討した。今年度は、高圧処理時の温度が、食中毒菌の低減に与える効果と、牛肝臓の肉質変化に与える影響を検討した。高圧処理時の温度は、室温の他 37 と 42 を検討した。300MPa 5 分間を 3 回反復する高圧処理を各温度帯で行ったところ、サルモネラ属菌は 25 で 1.5~2.1 log、37 で 3.2~3.6 log、42 で 5.2~6.4 log の低減を示した。リステリアモノサイトゲネスでは、25 で 6.0~6.6 log、37 で 7.0~7.7 log、の低減を示し、42 では定量法の検出限界以下となったものの、増菌培養により菌が検出され、完全な死滅とはならなかった。また、非選択分離寒天平板上と選択分離培地寒天平板上の集落数を比較したところ、いずれの条件でも集落数が大きく異なり、高圧処理により損傷菌が大量に発生していることが示された。高圧処理が牛肝臓の肉質変化に与える影響は、今回の条件においては高圧処理単独では硬さの変化は見られず、高圧処理の有無に関わらず、37 及び 42 の加温で柔らかくなる傾向が見られた。色調変化については加温単独の影響はほとんど見られなかったが、高圧処理により白化を示す L 値が上昇し、加温下での高圧処理により白化と共に黄色みを示す b 値も上昇する傾向が見られた。以上の結果から、牛肝臓中の高圧処理を行う際に加温条件下で行うことで、食中毒菌の菌数低減効果を大幅に高めることが可能であることが示された。一方で、今回実施した条件では肝臓の色調変化が強く、高圧処理の反復回数を減少させる、加温温度を 30~32 にとどめる等、色調変化を抑制する条件の検討が必要と思われた。

A. 研究目的

日本国内で平成 23 年に発生した、牛肉の生食による腸管出血性大腸菌集団食中毒事例をきっかけに、食肉及び内臓肉を生食することの危険性が広く再認識された。食の安全を確保するため、生食用牛肉の加工基準の設定、牛肝臓の生食用提供禁止及び豚肉（及びその内臓）の生食用提供の禁止という行政措置が実施された。一方で、牛肝臓の生食の安全性を確保することにより、規制の解

除を求める声もみられている。食肉と異なり、肝臓において病原微生物は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、生食用食肉の加工と同様の表面除去では食用部分から微生物を取り除くことはできない。肝臓等を生食するためには、非加熱殺菌による処理技術を確立し、感染リスクの低減を図る必要がある。

高圧処理は、非加熱殺菌法の中でも、食品本来の香り、色、風味が保持されるとして、近年注目

を集めている。昨年度の本研究においては、食中毒菌の菌数低減効果をより高める条件を見出すことを目的として、高圧処理について検討を行ったところ、サルモネラ属菌では処理前後に冷凍保存することにより、更に 1log の菌数低減が可能であったが、病原大腸菌においては冷凍保存の効果は見られなかった。今年度は、高圧処理時の温度を上昇させることにより、菌数低減効果をより高める条件を見出すことを目的として、検討を行った。

B. 研究方法

(1) 供試菌株

Salmonella enterica は昨年度した 3 菌株で最も高圧耐性の高かった JCM1652 株を用いた。

Listeria monocytogenes は ATCC19115 株（血清型 4b）を用いた。菌株は -80℃ に保存し、Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地に植え、単一集落を BHI 液体培地に接種して 37℃ で 20-24 時間静置培養したものを高圧処理試験に供した。

(2) 検体

菌液を用いた殺菌効果の高圧処理試験では、(1) の培養菌液を高圧処理用袋に分注後、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。

肉質変化についての高圧処理実験に用いる牛肝臓は、購入後、冷蔵状態で運搬した。肝臓検体は 20g に切断し、高圧処理前の硬度、色調を計測後、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

菌液を用いた高圧処理試験では、二重包装済みの菌液検体を、Dr. CHEF（神戸製鋼株式会社）を用いて 300 MPa での高圧処理を 3 回反復する条件で行った。処理温度は、設定圧力到達時の温度が 25℃ から 42℃ となるように設定した。牛肝臓

を用いた試験でも、検体を二重包装し、菌液と同様の条件を用いた。

(4) 加温処理

牛肝臓における(3)の対照群として、常圧で温度のみ上昇させた場合の肉質変化の検討を行った。高圧処理用袋に密封した肝臓検体を 37℃ 又は 42℃ に設定した恒温水槽に沈め、高圧処理に要する時間と同じ時間、加温処理を行った。

(5) 菌数測定

菌液を用いた高圧処理試験では、高圧処理後の包装を無菌的に開封し、菌液を滅菌生理食塩水中で 10 倍階段希釈して、各希釈列の各 100 μl をサルモネラ属菌では TS 寒天平板及び CHROMagar サルモネラ平板に、リステリアでは BHI 寒天平板及び CHROMagarListeria 寒天平板に塗布後、25℃ で好気培養を行い、24 及び 48 時間後に定型集落の計数を行った。

(6) 硬度及び色調

高圧処理前、高圧処理後及び加温処理後の肝臓検体について、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。

C. 結果

1. 高圧処理時の温度による菌数低減の効果

食肉への汚染が知られているグラム陰性菌であるサルモネラ属菌と、グラム陽性菌のリステリアについて、高圧処理を行う際の高圧容器の温度が菌数低減効果に与える影響を調べた。その結果、サルモネラ属菌は 25℃ で 1.5~2.1 log、37℃ で 3.2~3.6 log、42℃ で 5.2~6.4 log の低減を示した（図 1-1）。リステリアモノサイトゲネスでは、25℃ で 6.0~6.6 log、37℃ で 7.0~7.7 log の低減を示し、42℃ では定量法の検出限界以下となったものの、

増菌培養により菌が検出され、完全な死滅とはならなかった(図1-2)。また、非選択寒天平板上と選択分離培地寒天平板上の集落数を比較したところ、いずれの条件でも選択分離寒天平板上の集落数が非選択寒天平板上の集落数よりも大幅に低下しており、高圧処理により損傷菌が多く発生していることが示された。

2. 高圧処理時の温度が牛肝臓の肉質変化に及ぼす影響

1. 同じ条件で牛肝臓の高圧処理を実施したところ、25 での高圧処理により、硬度の指標である最大破断点(N 値)が5.655 から5.332 になっており、ほとんど変化が見られなかった。37 の処理においても、5.706 から5.431 と変化が少なかったが、42 の処理では3.608 から1.542 と大幅に軟化していた(図2)。高圧をかけない加温のみの処理では、37 で5.780 から3.218、42 で4.123 から3.437 と、軟化する傾向を示していた。色調変化については、25 での高圧処理により、明るさの指標であるL 値が28.0 から44.0、黄色みの指標であるb 値が7.2 から11.3 に増加したものの、赤みの指標であるa 値は不変であった。37 及び42 の処理においても同様の傾向を示したが、25 処理と比較して、両者ともb 値がより高い数値を示していた。肉眼による観察では、高圧をかけることで白化し、温度を上げることでより白みが強くなる傾向が見られた。一方、高圧をかけない加温のみの処理では、L 値、b 値共に変化がほとんど見られず、肉眼による観察でも加熱による色調の大きな変化は見られなかった。

D. 考察

今回の検討により、高圧処理時の温度を25 から37 に上昇させることにより、サルモネラ属菌では50~100倍、リステリアでは10倍程度の菌数低減効果が見られた。また、処理温度を42 にすることにより、さらに高い菌数低減効果が見られ

たものの、高圧と温度の組み合わせ処理により、牛肝臓の変色も強くなることが明らかとなった。一方、25 における菌数低減効果はサルモネラで2log、リステリアでは5.5log であり、サルモネラの方がより高圧耐性が高いことが示された。また、選択分離培地上の集落数と非選択培地上の集落数の差はサルモネラで4log 以上、リステリアで2log 以上見られ、高圧処理による損傷菌はサルモネラでより発生しやすいことが示された。以上の結果を踏まえ、次年度の検討は、2log の菌数低減効果を保ちつつ牛肝臓の変色をより少なくするために、25 と37 の間の温度帯での高圧処理と、前年度検討した高圧処理後の冷凍保管の組み合わせ等の検討を行う。更に、今後高圧処理の実用化に当たっては、食品の変色、硬さの変化を最低限にすると共に、損傷菌の発生を最小限にしつつ、殺菌効果の検証において損傷菌を高感度に検出する手法を用いることが、食品の衛生確保上重要であると思われた。

E. 結論

高圧処理時の温度が、食中毒菌の低減に与える効果と、牛肝臓の肉質変化に与える影響を検討したところ、牛肝臓中の高圧処理を行う際に加温条件下で行うことで、食中毒菌の菌数低減効果を大幅に高めることが可能であることが示された。一方で、今回実施した条件では肝臓の硬度は低下傾向を示したものの、大きな変化は示さなかった。色調変化は白化及び黄化する傾向が示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

原著論文：H Ogiyara, H Suzuki, M Michishita, H Hatakeyama, Y Okada. (2017) Effects of high hydrostatic pressure processing on the number of bacteria and texture of beef liver. Journal of Food

Quality, ID7835714, 7 pages

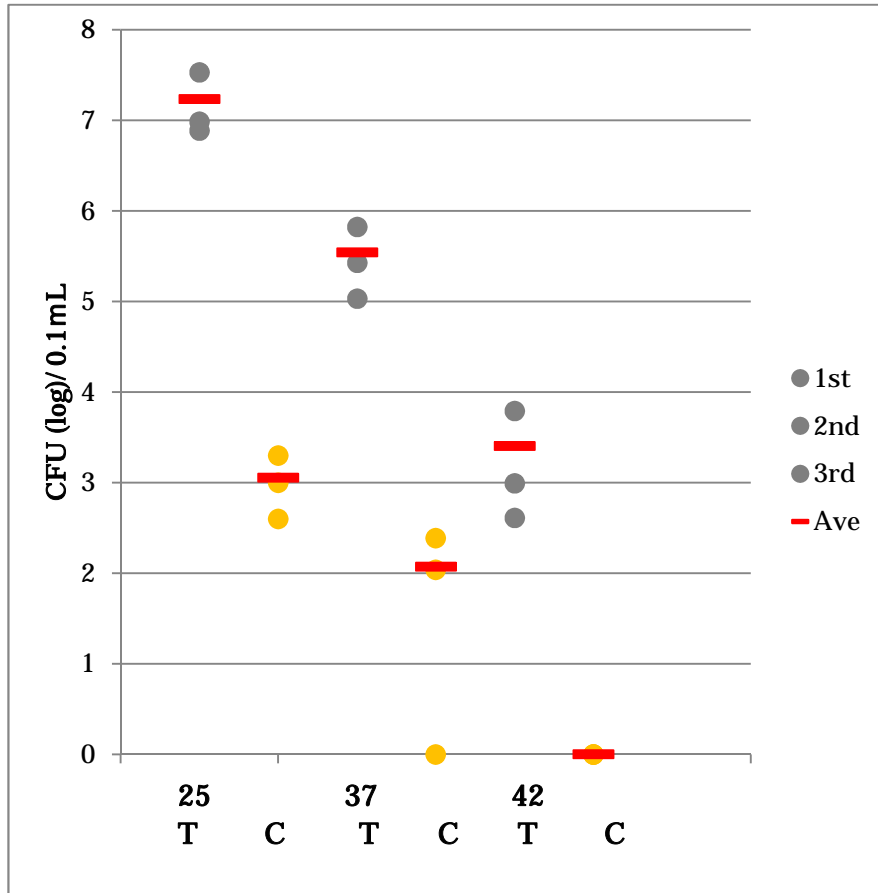
機構 . 第 91 回日本細菌学会 (2018 年 3 月)

学会発表 : 岡田由美子、鈴木穂高、百瀬愛佳 . 高
圧処理による *Listeria monocytogenes* の損傷と耐性

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

図 1-1 . 高圧処理 (300MPa5 分×3 回) 時の温度がサルモネラ属菌の低減に与える効果

処理前菌数は約 3×10^9 cfu/0.1mL

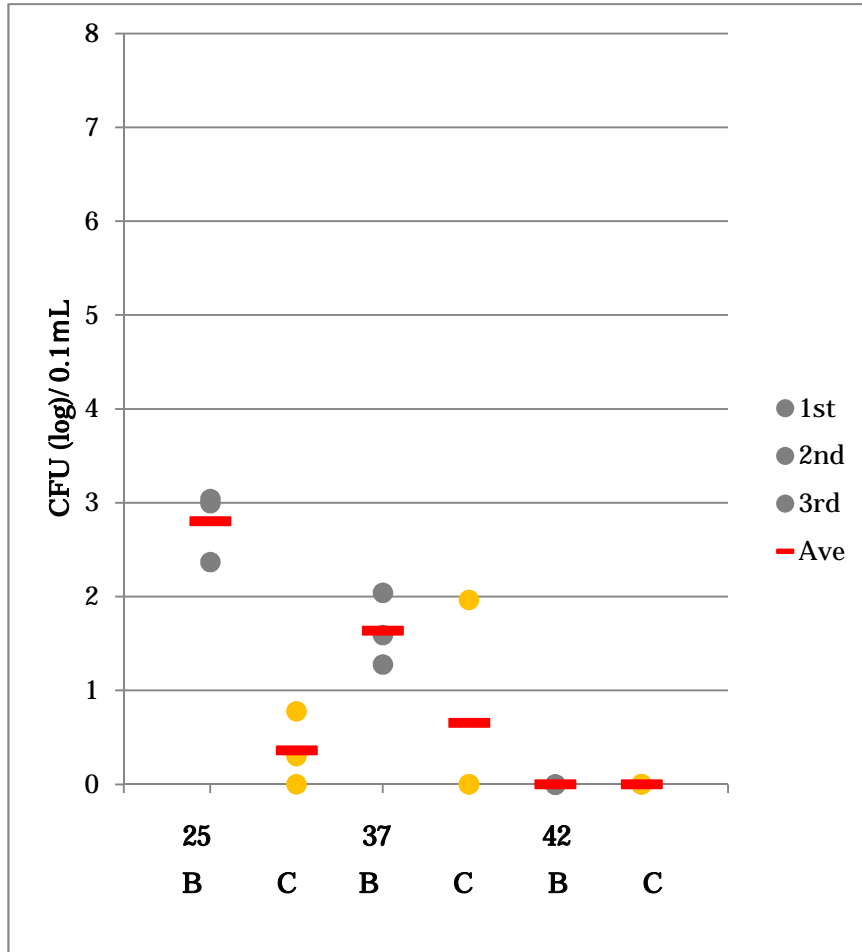


T: TSA 平板上の集落数

C: CRHOMagarSalmonella 平板上の集落数

図 1-2 . 高圧処理 (300MPa5 分×3 回) 時の温度がリステリアモノサイトゲネスの低減に与える効果







処理前菌数は約 3×10^9 cfu/0.1mL



B: BHI 寒天平板上の集落数

C: CHROMagarListeria 平板上の集落数

図2. 高圧処理時の温度が牛肝臓の肉質に及ぼす影響

温度			高圧なし		高圧有り			
	加熱前	加熱後	高圧前	高圧後	高圧前	高圧後		
25	硬度	N 値	5.655	-		5.655	5.332	
	色調	L 値	28.0	-		28.0	44.0	
		a 値	9.1	-		9.1	9.1	
		b 値	7.2	-		7.2	11.3	
37	硬度	N 値	5.780	3.218		5.760	5.431	
	色調	L 値	28.1	26.3		29.7	43.9	
		a 値	8.1	8		7.5	8.2	
		b 値	6.5	6.1		5.8	13.2	
42	硬度	N 値	4.123	3.437		3.608	1.542	
	色調	L 値	29.7	32.4		28.1	45.3	
		a 値	7.7	6.9		8.2	8.1	
		b 値	7.5	6.9		6.4	13.7	

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
川崎晋、 齋藤美枝、 持田麻里、 等々力節子	牛肝臓内部における <i>Campylobacter jejuni</i> の γ線照射による殺菌効果	日本食品科学工学会 誌)		印刷中	2018
H Ogihara, H Suzuki, M Michishita, H Hatakeyama, Y Okada	Effects of high hydrostatic pressure processing on the number of bacteria and texture of beef liver.	Journal of Food Quality	ID78 3571 4	7pages (オンライ ン)	2017

学会発表

発表者氏名	演題名	発表学会名	発表時期
岡田由美子、鈴木穂 高、百瀬愛佳	高圧処理による <i>Listeria monocytogenes</i> の損傷と耐性機 構	第 91 回日本細菌学会	2018年 3月