

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 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐々木 貴正

平成 31 ( 2019 ) 3 月

## 目次

### I. 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

佐々木 貴正

----- 1

### II. 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

----- 20

2. 牛肝臓摘出後の適切な保管・衛生対策に関する研究

佐々木 貴正 他

----- 38

3. 放射線照射による微生物除去

等々力 節子 他

----- 45

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

----- 66

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 71

平成30年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

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

岡田 由美子 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

中山 達哉 国立医薬品食品衛生研究所

野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所

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

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

戸嶋 章湖 兵庫県食肉衛生検査センター

清島 綾子 福岡県食肉衛生検査所

安達 俊輔 島根県食肉衛生検査所

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

(敬称略、順不同)

平成30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」

研究代表者 佐々木 貴正 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

**研究要旨：**2012年に牛肝臓の生食用としての提供・販売が禁止されたものの、依然として生食に対する要望がある。この再開を検討するためには、肝臓等の細菌汚染実態、非加熱殺菌技術の確立などに関する科学的データの集積が必要である。細菌汚染実態については、複数の自治体の協力の下、前年度まで可能な限り衛生的に採材を行った牛肝臓等の細菌汚染実態に関する知見を集積し、肝臓実質に一定の比率及び量で細菌汚染が存在することを確認した。今年度は、6～9月（夏季）及び12月～翌年2月（冬季）に、計7自治体が管轄する食肉センターにおいて、通常のとさつ・解体処理後に冷蔵保管された70頭の肝臓等について、出荷直前となったものを採取し、肝臓表面、胆嚢内胆汁、肝臓内部（右葉、左葉各2部位）の計6部位について、衛生指標菌の定量試験、及び腸管出血性大腸菌O157/O26/O111及びサルモネラ属菌の定性試験を行った。衛生指標菌のうち、糞便汚染指標である腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が肝臓内部より検出された個体数はそれぞれ16頭（22.9%）、19頭（27.1%）、8頭（11.4%）であり、前年度と比べて高い傾向であった。肝臓内部の腸内細菌科菌群の最大菌数は $7.1 \times 10^4$ CFU/gであった。同指標菌は8頭の胆汁からも検出され、うち6頭の肝臓内部からも検出されたが、胆汁で陰性の62個体のうち、52個体は肝臓内部でも同菌陰性であり、陽性となった場合にも最大菌数の1検体を除き、概ね $10^1$ CFU/gオーダーであった。なお、病原菌は全ての検体で培養陰性であった。牛肝臓摘出後の適切な保管・衛生対策については、前年度の研究により、と畜場における腹腔からの肝臓摘出後に冷蔵室（4℃）に保管した場合には、肝臓内部温度が体温（約39℃）から20℃まで低下するまで約4時間を要したため、肝臓内部に細菌が存在した場合には増殖する可能性があると考えられた。今年度は、冷凍（-30℃）した場合の温度変化について検討し、丸ごと、8（厚さ） $\times$ 10 $\times$ 20cm、8（厚さ） $\times$ 10 $\times$ 10cm又は5（厚さ） $\times$ 10 $\times$ 10cmを冷凍庫で保管した場合には、内部温度が20℃以下になるまでそれぞれ2時間30分、2時間、1時間30分又は1時間以内で達成できることが判明した。放射線照射による殺菌については、サルモネラの5桁低減に必要な線量を効率的に照射する方法を検討した。縦20cm $\times$ 横25cm、最大厚さ5cmの肝臓左葉を、厚さ方向を板状線源の正面に向けて両面照射した際の吸収線量の最大/最小比は1.104であり、同等の配置において照射時間を適切に設定すれば、肝臓左葉を8.2kGy～10kGyの範囲内で照射できる可能性が示された。高圧処理による殺菌については、高圧処理後に42℃で1時間の加温処理を行うことで、一般生菌の低減効果を約1log高められたが、肝臓の色調が白化及



び黄化する傾向を示し、生食用肝臓の十分なレベルでの非加熱殺菌と、肉質変化の抑制を両立させるのは難しいことが明らかとなった。

研究分担者：

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所  
岡田由美子 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  
食品研究部門

研究協力者：

中山達哉 国立医薬品食品衛生研究所  
野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所  
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  
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  
戸嶋章湖 兵庫県食肉衛生検査センター  
清島綾子 福岡県食肉衛生検査所  
安達俊輔 島根県食肉衛生検査所  
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

## A. 研究目的

牛肝臓の生食用としての提供・販売が2012年に禁止されたものの、依然として牛肝臓の生食に対する要望がある。牛肝臓の生食用としての提供・販売を再開するためには、牛肝臓の細菌汚染実態、非加熱殺菌技術の確立などに関する科学的データの集積が必要である。本研究では、まず、複数の食肉衛生検査所の協力の下、牛肝臓及び

胆汁における細菌汚染実態を定量的に検討し、地域性・季節性等の要因も踏まえた実態把握を行うことで細菌汚染リスクを勘案すると共に、肝臓への細菌移行経路に関する知見を収集する。次に、牛肝臓を生食する際には、肝臓内部に存在する細菌を殺菌する必要があるため、非加熱殺菌法の確立が不可欠である。そこで、非加熱殺菌技術の1つである放射線照射では、実用的な条件下における肝臓内部の線量分布や線量測定の不確かさも考慮した殺菌効果の検証を行い、生食用食肉と同様に微生物規格となり得る腸内細菌科菌群について、自然汚染検体の照射によって陰性とし得るか検証する。さらに、近年知られるようになった高圧処理技術についても、その殺菌効果を検証する。

以上の結果を統合し、より衛生的な畜産食品の提供に資する衛生管理及び危害低減手法の在り方に関する科学的知見の集積を図る。

## B. 研究方法

### 1. 牛肝臓等における細菌汚染実態に関する研究

本研究課題では、自治体の協力を得て、以下の試験を実施した。

#### 1.1. 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。

(iii) 生体検査において異常を認めない個体であること。

(iv) 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。

(v) 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）。

平成 30 年度は、前年度までと異なり、事業者により加工・冷蔵保管された出荷直前の肝臓を採取した。

採取した肝臓は速やかに 10℃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）、個体識別番号等についてはその都度記録した。

## 1. 2. 検体調整等

牛肝臓については、可能な限り無菌的に部位別に切り分け、検体とした。

### 1) 採材方法等について

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などして、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、胆汁、左葉内部 2 箇所、右葉内部 2 箇所の計 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

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、その上に胆嚢が上部となるように肝臓を配置した。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

供するまで、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

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。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。

#### 肝臓内部

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及び左葉内側を切り出し、それぞれ滅菌シャーレに取り分けた。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、右葉内側及び右葉外側を切り出し、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、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。この際、滅菌済メス及びピンセットは 1 面切るとに、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。

### 1. 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。

### 1. 4. DNA 抽出

上記 1. 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。

### 1. 5. STEC 及びサルモネラ属菌の定性試験

上記 1. 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  $\mu$ 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。

### 1. 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

1 自治体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、肝臓内部及び胆汁の細菌汚染実態について、上項 1. 2. から 1. 5 に準じて評価した。

## 2. 牛肝臓摘出後の適切な保管・衛生対策に関する研究

本研究は、1 と畜場の協力の下で実施した。当該と畜場は、肥育牛及び交雑種のと殺・解体を実施している。なお、当該と畜場における牛肝臓の取り扱いについては、①肝臓摘出後、②と畜検査員によると畜検査後に、③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、④洗浄されたステンレス製作業台に置かれ、⑤胆嚢切除後に、⑥水切り台に肝臓を置き、⑦次亜塩素酸水で表面を洗浄後、⑧ビニール袋に入れられ、⑨氷水中に約 10 分間浸漬される。その後、⑩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⑪冷蔵室（設定値 4℃）で翌日まで保管される。その後、⑫翌日午前加工販売業者に出荷という経緯をたどる。

### 2. 1. 胆汁及び肝臓の採取

胆汁採取は、⑤のステンレス製作業台のある作業室で待機し、肝臓から胆嚢を切除した直後に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、当研究所に持ち帰り、3 時間以内に試験に供した。肝臓は、⑫の出荷時に内臓取扱業者の立ち合いの下で、採取し、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. 2. 肝臓左葉最厚部の測定

81 頭の肝臓左葉部の最厚部の測定は、⑦

の次亜塩素酸水洗浄直後に実施した。計測は、左葉最厚部の高さを、定規を用いて 0.5 cm 刻みで行った。

### 2.3. 肝臓内部の温度変化

丸ごとの肝臓を当研究所に持ち帰り、丸ごと又は部分的に切断（小分け）し、ウォーターバスで約 39℃ まで温めたのち、深さ 4 cm の部分に温度ロガー（おんどとり）を取り付けて、冷凍庫（-30℃）に入れて温度変化を計測した。

各条件下の試験を 3 回繰り返し、各条件下の平均温度で比較した。

### 2.4. 胆汁中におけるサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の増殖性

腸内細菌科菌群陰性の胆嚢内胆汁 5 検体を 1 プール検体として使用した。

胆汁にミューラー・ヒントン液体培地で 1 夜培養（37℃）した菌株（ヒト由来志賀毒素産生性大腸菌（STEC）0157 株 2 株、ヒト由来 *Salmonella* Typhimurium 株 2 株及びヒト由来 *S. Enteritidis* 株 2 株）を終濃度が約 2~3 log CFU/mL となるように胆汁に懸濁し、38℃ で 5 時間培養した。なお、菌株未添加胆汁を陰性対照とした。菌数計測は、培養後の検体を PBS で 10 倍段階希釈し、3 M 社製のペトリフィルム（EB プレート）に各濃度 2 枚に 1 mL ずつ添加し、培養後に集落数を計測した。なお、集落が観察された場合には、1 検体につき 4 集落を採取し、菌種の同定を行った。

### 2.5. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験

腸内細菌科菌群の定量試験については、PBS を用いて胆汁を 10 倍段階希釈し、3 M 社製のペトリフィルム（EB プレート）に各濃度 2 枚に 1 mL ずつ添加し、培養後に集落数を計測した。また、前年度の検体を含め、腸内細菌科菌群陽性検体については、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験を行った。志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験は、胆汁を PBS で 10 倍希釈し、37℃ にて約 24 時間培養後、培養液 1 mL を 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに分注した。16,000 × g 以上で 5 分間遠心後、上清を取り除き、沈査に 100 μl 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 0157 特異的遺伝子について PCR 法により検出した。サルモネラの分離試験は、ISO 法に従った。

## 3. 放射線照射による微生物除去に関する研究

### 3.1. 材料

牛肝臓の採材部位は、他の分担研究の結果から、最も微生物汚染が少ないと考えられる、左葉部分を対象とした。微生物試験用の牛肝臓試料は、食肉処理場にて屠殺直後に取り出して急冷し、牛肝臓塊より左葉（約 0.9 kg~2.74 kg）を切り出して用いた。また、商業用施設での線量分布を予備的に調査するための模擬試料として、市販の板こんにゃく（14 × 7.5 × 2.5 cm 密度約 0.988 g/cm<sup>3</sup>）を用いた。

### 3.2. ガンマ線照射施設

ガンマ線照射は、①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

研究所（量研、高崎研）のガンマ線照射施設（7 セル）にて静置の両面照射を、②コーガイソトープ株式会社 1 または 3 号機にて、トートボックスを用いた連続照射を行った。

①は照射室に配置された照射台上に試料を設置して照射するもので、前年までの試験により、線源保護板から 20 cm 以上の距離に試料容器（400 mm（横）× 240 mm（縦））を設置した際には、試料容器表面における線量分布がほぼ均一であることが確認されている。なお、試料の厚さ方向の線量の均一性を保つために、照射時間の半分で試料を反転させ両面から照射を実施した。

②の商業用施設は、ノーディオン社製ガンマ線照射装置 2 基、JS-7500 (60-Co 約 66.6 PBq) および JS-7500 (60-Co 約 3.3 PBq) を備えている。これらの装置には、専用照射容器として、ステンレス製のトートボックス（長さ 58 cm × 幅 46 cm × 高さ 89 cm）による連続搬送設備が付属しており、照射試料はトートボックス中に充填され、コンベア上を連続移動して照射室へ入る。照射室内のトートボックスは、室内中心にある板状線源を取り囲むように配置されたコンベア上を、ポジションを変えながら移動してゆく。各トートボックスは、設定されたサイクルタイムにより滞在時間を規定され、最終的に板状線源の両側を通過することで、容器内の試料が連続的に両側面から一定線量で照射される。

### 3.3. 肝臓左葉および小片の静置照射における線量分布確認

牛肝臓左葉（1,800g、20 cm × 25 cm、厚さ 50 mm）を 2 枚に切断して中心内面 5 か所にアルミ蒸着シートで包装したアラニンペレ

ット線量計を挟み、その後 2 枚を重ねて元の形状に戻してガスバリア袋で脱気包装した。包装後の外面にも線量計を張り付けた。

薄切りした肝臓小片を作成し、その 5 枚を 10 cm × 7 cm の発泡スチロール皿に並べ、切り身の間および皿表面に線量を装着し、ガスバリア袋で脱気包装した。包装した袋の上面にも線量計を取り付けた。この状態の試料を 2 皿分（肝臓重量：84.6g 及び 87g）作成した。なお、包装試料の肝臓部分の厚さは約 1 cm であった。

包装し線量計を取り付けた左葉は、ほぼ同面積の紙箱に入れ、トレー入りの切り身肝臓は、2 つのトレーを重ね、それぞれ厚さ方向の中心をそろえて、発泡スチロール箱（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））に入れ、高崎量子応用研究所の照射室にて、線源保護板からレバーの厚さ中心までの距離が 30 cm、高さ中心が 22.5 cm となるように立てかけて、前面から室温にて照射した。線量率は約 1.5 kGy で、照射時間の半分（4 時間）で試料を反転した。

吸収線量の確認は、照射試料の外箱の基準位置（試料中心位置と同じ距離の箱側面）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、上述のように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）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。

### 3. 4. 連続照射における線量分布予備試験

肝臓の模擬試料として板状のこんにやくを縦・横 3 枚ずつ 1 面 9 枚となるように並べ、これを 2 段 (2 枚重ね (厚さ 5 cm) または、4 枚重ね (厚さ 10 cm) となるように固定した。各こんにやくの中心表面と重ね合わせたこんにやく板の間、および側面にあたる箇所にアルミ蒸着シートに封入したアラニン線量計を張り付けた。

作成した立方体上の模擬試料 (22 cm × 42 cm × 厚さ : 50 mm または 10 mm) を、発泡スチロール箱に立てて箱の中央に設置し、すきまに発泡スチロールを埋めて固定した。この発泡スチロール箱を、照射装置に付属したトートボックスに 2 段重ね (こんにやく 2 枚重ね 厚さ 50 mm の模擬試料) または、中心部に 1 段 (こんにやく 4 枚重ね 厚さ 100 mm) をセットし、コーガアイソトープ社 1 号機 (1 サイクル、約 1 時間) で、目標線量 10 kGy または、3 号機で、予備照射として、サイクルタイム 2 分で 1 周照射して線量測定を行い、サイクルタイム 2 分 5 秒で 8 周照射し、目標最小線量 8.2 kGy を超えるような照射を行った。

線量測定は、ESR 測定装置 (ブルカー社製 e-scan) を用いて、アラニンラジカルに由来するシグナル強度を測定し、NPL アラニンを用いて同社で比較校正して作成した検量線を用いて線量を読みだした。照射時の試料温度は、31.1°C (2 枚重ね試料) または、19.3°C~22.4°C (平均 20.4°C) であった。

### 3. 5. 肝臓左葉の連続照射における線量分布

2 頭分の交雑牛の肝臓 (総重量 7.72 kg および 6.44 kg) から左葉 (重量 2.74 および 2.04 kg) を切り出し、前項 3 で示したように、アルミ蒸着シートに封入したアラニン線量計を切り開いた中心部及び包装後の表面にそれぞれ 5 か所、左葉 1 つにつき 15 か所ずつ取り付けた。この左葉試料を -80°C の超低温層にて凍結したのち、ドライアイスを用いて梱包して照射施設に送付した。

アラニン線量計が取り付けられた凍結肝臓試料は、発泡スチロール板に PP バンド (黄色) で固定し、発泡スチロール容器に立てて設置し、倒れないようにすきまに発泡スチロールを埋めた。そして、主なガンマ線照射面を遮らないようにドライアイス板を配置した。なお、試料表面には熱電対式温度プローブ (安立計器株式会社製ハンディタイプ温度計 HA-400E) の先端を差し込み、照射前後の温度測定を行った肝臓試料とドライアイスを詰めた発泡スチロール容器は、前項 4、の 1 段照射の位置と同じになるように、トートボックス中に配置し、コンベアにより、サイクルタイム 2 分 5 秒で 8 周照射した。

試料に取り付けたアラニン線量計の線量は、ドライアイス下で、校正照射を行ったアラニン線量計で作成した検量線を用いて線量を算出した。

### 3. 6. 肝臓左葉連続照射における殺菌効果

2 か所の食肉処理場 A、B において、それぞれ 6 頭および 5 頭分の肝臓左葉を得た。採材後の肝臓は、冷蔵状態で研究所に輸送し、入手直後 (と畜後 2 日目)、方形葉側の一部 (20~40g 程度) を微生物試験用にサンプリングし、残りを、ガスバリア袋 (PTS

袋；三菱ガス化学製、PB180250P 350×500mm)を用いて脱気包装し、直ちに-80℃の超低温槽で保管した。凍結状態の左葉は、商用照射施設に送付後、前項と同様に、トートボックスに装填して搬送し、ドライアイス下で照射を行った。なお、11個の肝臓検体は、48個のトートボックスに散在するように配置した。照射装置は前項5.と同様の運転条件とした。線量測定は、各々の肝臓左葉の厚さが最大及び最小となる部分の表面にアラニン線量計をとりつけて行った。

照射前の肝臓検体は、25gを225mLの滅菌緩衝ペプトン水に加えて、ストマッカーで10倍乳剤とした後、標準寒天平板およびVRBG平板(Oxoid)にて、一般生菌数及び、腸内細菌科菌群を計数した。

ガンマ線照射後の肝臓検体は、25gをサンプリングし、滅菌緩衝ペプトン水を加えて10倍乳剤とした後、35℃で一昼夜培養した。培養した菌液は標準寒天平板およびVRBG平板(Oxoid)に一白金耳を画線し、35℃で一昼夜培養し、腸内細菌科菌群の生残の有無を確認した。

#### 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

##### 4.1. 検体

高圧処理実験に用いる牛肝臓は、東京芝浦臓器株式会社から購入し、冷蔵状態で運搬した。肝臓検体は10g片に切断し、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。

##### 4.2. 高圧処理

二重包装済みの検体をDr. CHEF（神戸

製鋼株式会社）を用いて300 MPa10分間の高圧処理を行った。処理温度は、設定圧力到達時の温度が25℃なるように設定した。

##### 4.3. 加温処理

加温処理は、高圧処理用袋に密封した肝臓検体を42℃に設定した恒温水槽に1時間沈めることで行った。

##### 4.4. 菌数測定

処理後の肝臓検体は90 mLの滅菌リン酸緩衝液(PBS)を加えてストマッカー処理を行い、10倍乳剤を作成した。また、必要に応じてPBSを用いて10倍階段希釈液を作成した。一般生菌数の測定にはペトリフィルムACプレート(3M)及びTEMPO AC(バイオメリュー)、腸内細菌科菌群の測定にはペトリフィルムEBプレート(3M)及びTEMPO EB(バイオメリュー)、大腸菌の測定にはペトリフィルムSECプレート(3M)及びTEMPO EC(バイオメリュー)を用いた。検体希釈液接種後は35℃で好気培養を行い、24時間後に集落の計数を行った。

##### 4.5. 硬度及び色調

未処理、高圧処理後、加温処理後及び高圧処理後に加温処理を行った肝臓検体について、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. 牛肝臓等における細菌汚染実態に関する研究

#### 1.1. STEC 及びサルモネラ属菌の検出状況

供試検体（70頭×6部位＝420検体）について、PCRスクリーニング試験により、

遺伝子検出を行ったところ、自治体Eの施設で冬季に対象とした1頭の表面及び右葉内部外側の2検体、及び自治体Fの施設で夏季に対象とした1頭の左葉内部2検体でVT遺伝子が検出され、うち1検体についてはO157 特異的遺伝子も検出されたが、選択分離培養では陰性を示した。

## 1. 2. 衛生指標菌の検出状況

### 1) 指標菌別成績

#### (i) 細菌数

牛肝臓表面拭取り検体は、1頭を除く全てが陽性を示し、その平均値は $4.9 \times 10^4$ CFU/100cm<sup>2</sup>（最小値： $2.0 \times 10^1$ CFU/100cm<sup>2</sup>、最大値： $1.1 \times 10^6$ CFU/100cm<sup>2</sup>）であった。

胆汁については、計15頭が陽性を示し、最大値は $3.6 \times 10^7$ CFU/mLであった。

左葉内部・右葉内部では、それぞれ36頭（陽性率51.4%）および39頭（同55.7%）が陽性を示し、肝臓内部全体での最大値は、 $9.6 \times 10^4$ CFU/g、陰性も含めた全体の平均値は $1.1 \times 10^3$ 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、40頭では腸内細菌科菌群が検出され（57.1%）、最大値は $2.9 \times 10^5$ CFU/100cm<sup>2</sup>であった。また、夏季と冬季の陽性率はそれぞれ68.6%及び45.7%と夏季で高い傾向にあった。

胆汁では8頭が陽性（陽性率10.0%）となり、最大値は $1.1 \times 10^7$ CFU/mLであった。

肝臓内部は、左葉のみ陽性が3頭（最大値 $6.2 \times 10^2$ CFU/g）、右葉のみ陽性が5頭（最大値 $8.0 \times 10^1$ CFU/g）、両葉とも陽性が8頭（最大値 $7.1 \times 10^4$ CFU/g）であった。

#### (iii) 大腸菌群

表面拭き取り検体では、35頭から大腸菌群が検出され（46.4%）、最大値は $2.3 \times 10^5$ CFU/100cm<sup>2</sup>であった。また、夏季・冬季の陽性率は62.9%及び37.1%と、腸内細菌科菌群と同様の傾向を示した。

胆汁は、5頭が陽性となり（陽性率7.1%）、最大値は $8.0 \times 10^6$ CFU/mLであった。

肝臓内部では、左葉のみ陽性が2頭（最大値 $2.9 \times 10^3$ CFU/g）、右葉のみ陽性が8頭（最大値 $1.6 \times 10^2$ CFU/g）、両葉とも陽性が9頭（最大値 $3.4 \times 10^4$ CFU/g）であった。

#### (iv) 大腸菌

表面拭き取り検体は24頭で大腸菌陽性となり、最大値は $2.3 \times 10^5$ CFU/100cm<sup>2</sup>であった。季節別では夏季が15頭、冬季が9頭陽性を示した。

胆汁では6頭が陽性となり（陽性率8.6%）、最大値は $6.8 \times 10^6$ CFU/mLであった。

肝臓内部検体では、左葉のみまたは右葉のみ陽性が各2頭（最大値 $2.9 \times 10^2$ CFU/gまたは $6.0 \times 10^1$ CFU/g）、両葉とも陽性が4検体（最大値 $8.6 \times 10^4$ CFU/g）であった。

## 2) 施設別の成績比較

### (i) 自治体A

自治体Aでは夏季5頭分、冬季5頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約70%であった。検査終了後の肝臓は、とちく作業員により切除され、清浄なプラスチックコンテナに入れて内臓処理事業者に渡されていた。同事業者では専用の刀を用いて整形し（使用後の刀はバケツのため水で洗浄）、オーバーフロー式の洗浄槽内で洗浄・冷却していた。その後、一頭分ごとにビニール袋に入れ、金属探知機を通して異物検査を行い、3℃以下の冷蔵庫内に入れ、1～2頭



分毎に保管用バット上で平均 18~24 時間保管していた。

計 10 頭分の牛肝臓等のうち、1 頭分については内部に肝膿瘍が認められたため、廃棄対象とし、残り 9 頭分を正常検体として検査成績を集計した。

胆汁については、9 頭分のうち、1 頭分のみで腸内細菌科菌群 ( $1.5 \times 10^7$  CFU/mL)、大腸菌群 ( $1.1 \times 10^7$  CFU/mL)、大腸菌 ( $6.8 \times 10^6$  CFU/mL) が検出された。肝臓内部から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検出されたものは 7 頭分に留まり、それぞれの最大値は特定の個体由来の検体に限局していた ( $1.6 \times 10^2$  CFU/g,  $2.3 \times 10^2$  CFU/g,  $2.3 \times 10^2$  CFU/g)。

肝臓表面からは、一般細菌数が 9 頭分全てから検出され、その平均値が  $6.6 \times 10^4$  CFU/100cm<sup>2</sup> であったほか、腸内細菌科菌群は計 5 頭分より検出され、陰性検体を含む平均値は  $1.2 \times 10^2$  CFU/100 cm<sup>2</sup> であった。

#### (ii) 自治体 B

自治体 B では夏季 5 頭分、冬季 5 頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約 66% 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され、検査を受けていた。その後、同レーン上に懸架された状態で処理室に移動され、水で洗浄冷却後、まな板上で整形後、一頭分ずつビニール袋に入れ、氷を敷き詰めた専用箱に入れて 6 頭分毎に 4.4℃ 以下の冷蔵庫内に移送・保管 (約 18 時間) されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 30 分であった。

胆汁については、1 頭分のみで腸内細菌

科菌群 ( $8.1 \times 10^5$  CFU/mL)、大腸菌群 ( $2.5 \times 10^3$  CFU/mL)、大腸菌 ( $2.1 \times 10^4$  CFU/mL) が検出された。

肝臓内部から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検出されたものは 1 頭分に留まり、それぞれの最大値は  $6.2 \times 10^2$  CFU/g,  $3.0 \times 10^1$  CFU/g,  $2.9 \times 10^2$  CFU/g であった。

肝臓表面からは、一般細菌が 10 頭分全てから検出され、平均値が  $7.2 \times 10^3$  CFU/100cm<sup>2</sup> であったほか、腸内細菌科菌群は 3 頭分より検出された (陰性検体を含む平均値は  $1.1 \times 10^1$  CFU/100cm<sup>2</sup>)。

#### (iii) 自治体 C

自治体 C では夏季 5 頭分、冬季 5 頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約 98% であった。牛肝臓は摘出後、速やかに検査台上で検査を受け、とちく検査員により胆嚢が切除された後、一頭分ずつプラスチック製箱に入れて、内臓処理に供されていた。同加工施設での製造加工実態については回答が得られなかった。

胆汁については、全 10 頭分で一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検出されなかった。

肝臓内部から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌は何れの個体からも検出されず、1 頭分のみで一般細菌が検出された ( $4.6 \times 10^3$  CFU/g)。

肝臓表面からは、一般細菌が 9 頭分から検出され、その平均値は  $5.4 \times 10^3$  CFU/100cm<sup>2</sup> であった。また、腸内細菌科菌群は 3 頭分より検出され、陰性検体を含む平均値は  $2.5 \times 10^2$  CFU/100cm<sup>2</sup> であった。

#### (iv) 自治体 D

自治体 D では夏季 5 頭分、冬季 5 頭分の

牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約 58%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され、検査を受けていた。その後、同レーン上に懸架された状態で処理室に移動後、まな板上で専用器具を用いて整形し、流水洗浄していた。一頭分ずつ清浄なビニール袋に入れ、他臓器と区分けできるよう、専用箱に入れて 10℃以下の冷蔵庫内に移送し、臓器別に区分けできるよう、カゴに分別して保管されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 2.5 時間であった。

胆汁については、2 頭分で腸内細菌科菌群 ( $3.6 \times 10^5$ ,  $5.7 \times 10^5$  CFU/mL) 及び大腸菌群 ( $1.6 \times 10^5$ ,  $2.9 \times 10^5$  CFU/mL) を認めたほか、1 頭分で大腸菌 ( $4.8 \times 10^4$  CFU/mL) が検出された。

肝臓内部から腸内細菌科菌群は 3 頭分より検出され、その最大値は右葉内側で検出された  $3.7 \times 10^4$  CFU/g であった。大腸菌群は 2 頭分、大腸菌は 1 頭分より検出され、最大値はそれぞれ  $3.4 \times 10^4$  CFU/g,  $7.2 \times 10^2$  CFU/g であった。

肝臓表面からは、一般細菌が 10 頭分全てから検出され、平均値が  $8.8 \times 10^4$  CFU/100cm<sup>2</sup> であったほか、腸内細菌科菌群は 5 頭分より検出された（陰性検体を含む平均値は  $2.9 \times 10^4$  CFU/100cm<sup>2</sup>）。

#### (v) 自治体 E

自治体 E では夏季 5 頭分、冬季 5 頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約 38%であった。牛肝臓はとたいより摘出後、速やかに吊下げレーンで運搬され、検査を受け、懸吊状態でビニール袋を全体に被せ、内臓

処理室に搬送されていた。その後、レーンから外し、流水洗浄および氷を用いた冷却が行われることもあるとのことであった。最終的に、一頭分ずつ清浄なビニール袋に入れ、他臓器と区分けできるよう、専用箱に入れて 10℃以下の冷蔵庫内に移送し、臓器別に区分けできるよう、カゴに分別して保管されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 10 分～1 時間であった。

胆汁については、2 頭分で腸内細菌科菌群 ( $1.0 \times 10^0$ ,  $3.5 \times 10^5$  CFU/mL) 及び大腸菌群 ( $2.9 \times 10^5$  CFU/mL) を認めたほか、1 頭分で大腸菌 ( $2.1 \times 10^4$  CFU/mL) が検出された。

肝実質から腸内細菌科菌群は 4 頭分で検出され、その最大値は  $2.3 \times 10^3$  CFU/g であった。また、大腸菌群は 9 頭分で検出され、最大値は  $2.7 \times 10^4$  CFU/g であった。大腸菌は 2 頭分で検出され、その最大値は  $3.0 \times 10^3$  CFU/g であった。

肝臓表面からは、一般細菌が 10 頭分全てから検出され、平均値は  $3.5 \times 10^4$  CFU/100cm<sup>2</sup> であったほか、腸内細菌科菌群は 5 頭分より検出された（陰性検体を含む平均値は  $4.7 \times 10^2$  CFU/100cm<sup>2</sup>）。

#### (vi) 自治体 F

自治体 F では夏季 4 頭分、冬季 6 頭分の牛肝臓等を対象に検討した。うち、冬季の 1 頭分については、検査時に異常（出血斑）を認めたため、検討対象から除いた。

同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約 80%であった。牛肝臓はとたいより摘出後、肺、心臓、脾臓と共に専用のベルトコンベアーに乗せられ、検査を受けた後、滑り台を通じて内臓処理室へ移送されていた。その後、赤物専用作業台上で流水洗浄

し、胆嚢を除去後、酸性電解水で肝臓表面を流水洗浄してから、包装せず、氷を敷き詰めた専用カゴに入れ、約 30 分室内保管後、カゴ全体を覆う専用シートをかぶせた状態で 10℃以下の冷蔵保管室へ移送し、臓器別にカゴ単位で区分化しているものの、胃腸が入ったカゴが一番上に、その下に他臓器が重ねられて一頭分ずつ縦に管理されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 30 分～1 時間であった。

胆汁は、夏季の 2 頭分で腸内細菌科菌群 ( $5.3 \times 10^4$ CFU/mL または  $1.2 \times 10^7$ CFU/mL) を認め、うち 1 頭分は大腸菌群及び大腸菌も陽性であった。

肝実質から腸内細菌科菌群は 3 頭分で検出され、その最大値は  $7.1 \times 10^4$ CFU/g であった。また、大腸菌群及び大腸菌はそれぞれ 4 頭または 3 頭より検出され、最大値は  $8.6 \times 10^4$ CFU/g または  $8.6 \times 10^4$ CFU/g であった。

肝臓表面からは、一般細菌が 9 頭分全てから検出され、平均値は  $3.2 \times 10^5$ CFU/100cm<sup>2</sup> であったほか、腸内細菌科菌群は 8 頭分より検出された（陰性検体を含む平均値は  $4.1 \times 10^4$ CFU/100cm<sup>2</sup>）。

同施設では特に肝臓表面の糞便汚染指標菌数が夏季に高くなる傾向が認められた。

#### (vi) 自治体 G

自治体 G では夏季 6 頭分、冬季 6 頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するところ検査合格率は約 46% であった。牛肝臓はとたいより摘出後、速やかに専用バットに入れられ、スロープ上を滑らせた後、検査を受けた。胆嚢を除去後、ビニール袋に入れられ、ステンレス容器に格納され、心臓、テール、横隔膜とともに、内臓処理室へ搬送された。その後、肝門脈

付近の脂肪・リンパ節等を整形し、100ppm 次亜塩素酸ナトリウムを添加した氷水中で約 3 分間浸漬冷却したものを清浄なビニール袋に入れ、密封したものを氷水中に浸漬し、更に冷却を行った。金属探知機を通して異物検査を行った後、10℃以下の冷蔵庫内へ移送し、臓器別に区分できるよう、カゴに分別して保管されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 4 時間であった。

胆汁については、全 12 頭分で腸内細菌科菌群、大腸菌群、及び大腸菌は陰性であった。

肝実質から腸内細菌科菌群は 1 頭分のみで、大腸菌群は 2 頭分で検出され、最大値はいずれも  $1.0 \times 10^1$ CFU/g であった。大腸菌は全 12 頭分で認められなかった。

肝臓表面からは、一般細菌が 12 頭分全てから検出され、平均値は  $2.8 \times 10^4$ CFU/100cm<sup>2</sup> であったほか、腸内細菌科菌群は 11 頭分より検出され、陰性検体を含む平均値は  $3.2 \times 10^2$ CFU/100cm<sup>2</sup> であった。大腸菌群は 7 頭分で、大腸菌は 4 頭分で検出され、陰性検体を含む平均値はそれぞれ  $5.2 \times 10^1$ CFU/100cm<sup>2</sup>、 $1.3 \times 10^1$ CFU/100cm<sup>2</sup> であった。

#### 1.3. 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

胆汁中で腸内細菌科菌群陽性を示した個体（7 頭）では肝実質両葉で同指標菌の分布を認めた。一方、胆汁中で同指標菌陰性の個体（63 頭）のうち、54 頭は肝実質に同指標菌を認めず、2 頭では左葉のみ、6 頭では右葉のみ、1 頭は両葉に同指標菌を認めた。しかしながら、肝実質における同指標

菌数は最大で  $6.4 \times 10^3$  CFU/g であり、概ね  $10^1$  オーダー CFU/g に留まっていた。

これらのうち、肝実質から  $10^3$  CFU/g 以上の腸内細菌科菌群を認めた計 5 個体について、胆汁中の同指標菌数を整理した結果、1 個体（自治体 B の冬季 1 頭分；胆汁  $8.1 \times 10^5$  CFU/mL、肝実質  $6.2 \times 10^2$  CFU/g）が陰性であったほかは、 $4.2 \times 10^3 \sim 5.7 \times 10^5$  CFU/mL と比較的高い水準で分布を示した。

以上の成績より、胆汁中に同指標菌の高濃度汚染を認める個体では、肝実質においても同指標菌の高濃度汚染を受ける傾向が認められた。

#### 1. 4. 胆汁または肝実質から $10^3$ CFU/g または mL 以上の腸内細菌科菌群が検出された代表個体における菌叢解析

胆汁及び肝実質内において多くの腸内細菌科菌群を認めた代表 3 検体（F-VI、D-VI、E-IV）について各部位の構成菌叢を解析したところ、何れも大腸菌が共通した優勢菌叢として、表面、胆汁のほか、実質においても認められた。特に、個体 D-VI での大腸菌占有率は実質でも高値を示し、右葉では 80% を超える高値を認めた。

### 2. 牛肝臓摘出後の適切な保管・衛生対策に関する研究

#### 2. 1. 肝臓左葉最厚部の測定

供試した肝臓 81 検体は、黒毛和種 64 頭及び交雑種（黒毛和種 × ホルスタイン）17 頭に由来し、と殺時の平均月齢は 30 か月（最小 25 か月、最大 37 か月）であった。最厚部の範囲は 5～8.5 cm であるが、8 割は 6～8 cm の間であった。8 cm 以上であったの

は 5 頭で、そのうち 1 頭（27 か月の交雑種）の左葉最厚部は 8.5 cm であった。

#### 2. 2. 肝臓内部の温度変化

摘出直後の肝臓内部温度は約  $39^\circ\text{C}$  であり、牛肝臓の丸ごとを冷蔵保管（約  $4^\circ\text{C}$ ）した場合には、肝臓内部温度が  $20^\circ\text{C}$  以下（ミューラー・ヒントン液体培地及び胆汁中のサルモネラがほぼ増殖しなくなる温度）になるまでそれぞれ約 4 時間を必要とした（H29 年度調査）。一方、冷凍保管（ $-30^\circ\text{C}$ ）した場合には、丸ごとでは 2 時間 30 分と約半分に短縮された。さらに、8（厚さ） $\times$ 10 $\times$ 20cm、8（厚さ） $\times$ 10 $\times$ 10cm 又は 5（厚さ） $\times$ 10 $\times$ 10cm と小分けにした場合には、2 時間、1 時間半又は 1 時間以内に  $20^\circ\text{C}$  以下にすることができた。

#### 2. 3. 胆汁中におけるサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌の増殖性

事前検討試験の結果、胆汁に接種する菌液調整は、ミューラー・ヒントン液体培地で培養したものの方が迅速に増殖したことから、この方法を用いることにした。

本菌液調整法を用いた試験では、供試した 6 株とも 5 時間後には、 $3.3 \sim 3.8 \log$  CFU 以上増加した、菌株未添加胆汁からは培養 5 時間後でも菌の発育は認められなかった。

#### 2. 4. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験

前年度の検体を含めた計 139 検体のうち 13 (9.4%) 検体から分離され、陽性検体の菌濃度はすべて  $10^6$  CFU/mL 以上と陽性検体の腸内細菌科菌群濃度は高かった。なお、こ

れら陽性検体からは、増菌培養時に菌増殖が認められたものの、サルモネラでも志賀毒素産生性大腸菌 0157 でもなく、その他の腸内細菌科菌群であると考えられた。

### 3. 放射線照射による微生物除去に関する研究

#### 3. 1. 静置照射における肝臓(左葉)および切り身試料中の線量分布

薄く切ってほぼ均一な厚さに包装した切り身(85~89g 程度、厚さ：10 mm)に張り付けた線量計の吸収線量は、平均で 12.67 kGy 及び 12.53 kGy、左葉(1,800 g 最大厚さ 50 mm)のそれは、平均で、12.24 kGy と、厚さの大きな左葉に比べて、切り身の吸収線量はやや大きくなった。また、試料内の線量の変動も小型に成型した切り身のほうがやや小さく、線量の最大/最小比(DUR: Dose Uniformity Ratio)は、1.05~1.06 程度であった。一方、試料内の厚さも不均一で最大厚さの大きな左葉の DUR は、1.104 となった。ただし、左葉の DUR から、腸内細菌科菌群であるサルモネラの 5 桁低減に必要な最小線量の 8.2 kGy となるように照射時間を設定した際の最大線量は 9.02 kGy と算定されることから、十分に狭い線量分布範囲での照射が可能であると判断された。凍結状態(ドライアイス下)で、肝臓を照射するためには、前面から来るガンマ線の照射方向を遮らないように、例えば、肝臓の背面からドライアイス当て、肝臓を途中で反転しながら同位置にて両面照射を行えば、同型の肝臓左葉を同様に良好な線量分布で照射を行うことが可能と考えられた。

#### 3. 2. 連続照射(商業施設)における模擬試

料の線量分布

通常、商業ベースで受託照射を行っているガンマ線照射施設では、規定の大きさの専用容器(トートボックス)中に照射試料を詰め、コンベアやハンガーリフト方式で、トートボックスを、定められた搬送経路で移動させ、コバルト 60 線源の周りを設定した速度で通過することで照射を行っている。トートボックス内は、照射試料の位置やボックス内の試料との相互作用により、吸収線量分布が生じる。

本研究において、実証例として使用した商業施設では、長さ(板状線源に平行する横幅)58cm x 幅(線源からの距離方向の奥行)46 cm、高さ 89 cm のステンレス製のトートボックスが搬送系で利用されている。線源との位置関係から、高さ方向及び幅(奥行)方向の線量分布が生じることが予測された。そして、できるだけ均一な線量分布となる照射を行うためには、幅(奥行)方向に対して、可能な限り薄い試料をトートボックスの中心部に立てるように配置することとが有効であると考えられた。

そこで、このような試料配置におけるガンマ線の厚さ方向の透過力と面方向の均一性を予備的に探るため、板状のこんにやく(密度：0.988 g/cm<sup>3</sup>)を用いてその表面と中心部の各位置での線量分布を求めた。

次に、2枚重ねのこんにやくを9組(厚さ 50 mm)として、発泡スチロール箱に入れトートボックス内に2段重ねにした配置において、約 10 kGy を目標として照射した。上下2段に入れた発泡スチロール箱中の模擬試料(厚さ 50 mm)の吸収線量は、下段の箱中で 9.34~10.66 kGy 上段の箱中では 9.69~10.64 kGy、全体では 9.34~10.66 kGy

(中央値 10.0 kGy 平均値 10.01 kGy)、DUR(最大/最小比)は全体でも 1.14 と良好な分布を示した。この照射条件では、サイクルタイムを 1 週の照射で 10 kGy (照射時間は約 1 時間)となるようにセットしていることから、サイクルタイムを適切に設定すればサルモネラの 5 桁低減に必要な最小線量である 8.2 kGy を超え、10 kGy を下回る範囲での照射を実現できると考えられた。

さらに、4 枚重ね(厚さ 100 mm)のこんにゃくをいれた発泡スチロール箱をトートボックスの中央に 1 箱入れて照射した際の線量分布を調査した。照射は、コーガアイソトープ 3 号機を用い、最小線量が 8.2 kGy を上回るようにサイクルタイムを調節し、8 週照射とした。100 mmの厚さの試料では、線量は、前述の 50 mm厚さの試料に比べてより広範囲に広がり、最小線量は面方向の中心位置の試料の厚さ中心で、8.23 kGy、最大線量は試料角位置の表面にあたる場所で 10.13 kGy となり、DURは 1.22 であった。

### 3.3. 商用照射施設における連続照射での牛肝臓(左葉)の線量分布

模擬試料の線量分布から、試料の厚さが 80mm 程度までであれば、同様の配置において、目標範囲内の線量での照射が可能と予測した。そこで、厚さが 64.4 mm及び、76.2 mmの凍結した牛肝臓左葉を、前項の 100mm 厚さの模擬試料の照射時と同様に、発泡スチロール箱の中心に立てて配置し、照射試験を行うこととした。照射中の温度を保つため、主に試料上部にドライアイス置いて冷却した。この試料箱をトートボックスに 1 つずつ装填し、線源を 8 周、周回して

合計 17 時間かけて照射を行った。照射前および各周回の途中で、試料温度を測定した結果、照射前が $-67.9^{\circ}\text{C}$ 、照射終了後が $-66.7^{\circ}\text{C}$ で周回中の最小温度は $-70.1^{\circ}\text{C}$ であった。

最大厚さが 64.4 mmの試料 1 では、最小線量 8.94 kGy、最大線量 9.49 kGy であり、最大/最小比(DUR)は 1.062 となった。また、肝臓に張り付けた 15 個の線量計の吸収線量の平均は、9.17 kGy であった。一方、最大厚さ 76.2 mmの試料 2 では、吸収線量の平均は、試料 1 よりやや低い 8.92 kGy となり、最小線量 8.59 kGy、最大線量 9.33 kGy、DUR は 1.089 であった。いずれの試料も、同一のサイクルで照射を行ったこんにゃく(模擬試料厚さ 100 mm)よりも、小さな DUR となった。なお、最小線量を示した箇所は、両試料とも、凍結した試料の厚さが最大となる左葉の中央部であり、最大線量を示した箇所は、厚さが小さくなる左葉の先端部分である端側の表面部分であった。

牛肝臓照射の微生物制御に必要な線量は、最小 8.2 kGy であるが、仮に最大線量を定めるとすれば、コーデックス規格で一般的に認められている 10 kGy が想定される。上述の肝臓(左葉)試料における線量分布の測定結果は、線量測定の不確かさを 5%程度見込んで、この線量範囲で照射を達成できる可能性があることを示している。

### 3.4. 連続照射における肝臓左葉の殺菌効果

2 か所(A、B)の食肉処理場から肝臓左葉試料を調達し、合計 11 検体を脱気包装後に凍結し、前項と同様の条件で照射した。照射時の試料温度は、 $-52.3^{\circ}\text{C}$ ～ $-72.2^{\circ}\text{C}$ 、平均で $-67.2^{\circ}\text{C}$ であった。

試験に供した肝臓は、照射時の重量が、932g～2,350g、寸法 約 27～32 cm×17～28 cm、最大厚さが 38 mm～57 mm程度であった。照射後の吸収線量の測定結果は、試料厚が最大となる表面の部分で 8.69 kGy～9.46kGy、厚さが最小となる表面部分で 8.96～9.90 kGy であった。

この試験では、線量が試料内で最小となりうる、肝臓の内部線量を測定していないが、試料の最大厚さが、同一の条件で照射した、こんにやく試料(厚さ 100 mm)や、前項の肝臓試料(厚さ 74.6 mm)よりも小さい範囲にあることから、肝臓の内部であってもこれらの最小線量である 8.28 kGy を下回る部分は存在しないと考えられた。

今回照射した全 11 試料の最大線量(9.90 kGy)と最小線量(8.69 kGy)の比は 1.139 であり、測定した範囲に限定しても、前項で肝臓内部にも線量計を配置して求めた 2 つの肝臓の最大線量(9.49 kGy)と最小線量(8.59 kGy)の比である 1.104 を上回っている。11 個の肝臓試料それぞれの最大厚さは、38 mm～57 mm程度と、それほど大きくないため、個々の肝臓内の線量分布の範囲はそれほど大きくはないと考えられるが、肝臓の個数が増えたことで、個体間の厚さや形状のばらつきが大きくなり、同じバッチの照射試料全体の線量範囲が広がったと考えられる。また、実測した最大線量の 9.90 kGy は、線量測定の不確かさを考慮すると、線量上限を 10 kGy に設定した場合において十分な余裕は無く、バッチ全体の線量分布をより小さくする工夫が必要と考えられた。

肝臓試料の微生物汚染状況は、処理場 A で入手した肝臓の一般生菌数  $7.4 \times 10^2$

CFU/g～ $3.6 \times 10^3$  CFU/g、腸内細菌科菌群は、6 検体中 5 検体が検出限界未満、1 検体の菌数が  $4.5 \times 10^2$  CFU/g、処理場 B では、一般生菌数  $8.5 \times 10^4$  CFU/g～ $3.2 \times 10^5$  CFU/g、腸内細菌科菌群  $8.1 \times 10^2$  CFU/g～ $6.2 \times 10^3$  CFU/g であった。照射後の微生物検査に際し、検体から 25g をサンプリングし、これを前培養後に平板培養を行った結果、11 検体全てにおいて、一般生菌ならびに腸内細菌科菌群は不検出(陰性)となった。

多数の肝臓試料を複数のトートボックスに装填して効率的な照射を実行する場合、すべての試料におけるいずれの部位においても、線量範囲を目標範囲に収めるためには、個々の肝臓試料の形体(厚さ)をできるだけ揃えて再現良くトートボックス内の定位置に装填することが必要となる。そのためには、許容される DUR を達成できるように照射方向の奥行を小さくした立方体容器を設計し、その中にできるだけ比重を一定にして肝臓試料を充填し、各々のトートボックス内の試料配置と密度を揃えるなどの工夫が必要となる。

実際の商業照射施設を用いた効率的な連続照射の運用に際しては、基準とする線量の考え方を明確にした上で、各トートボックス内における肝臓試料の線量を、線量測定の不確かさを考慮しても、目的範囲に収れんさせる照射方法を決定する手順を定めるとともに、手順通りに照射が実施されたことを検証する手法についても、予め定めておくことが必要と考えられる。

#### 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

##### 4.1. 高圧処理後の加温処理による菌数低減

## の効果

処理前の肝臓からは一般生菌は 1.82～2.54log/g 検出されたが、高圧処理後に加温処理を行った検体では、3 検体全てにおいて 1.43～1.82log/g の菌数低減を示した。高圧処理のみで加温処理をしない検体では、0.59～0.78log/g の低減に留まり、高圧処理後の加熱処理により高圧処理単独よりも 0.83～1.18log 低減した。加温のみでは、3 検体中 1 検体のみで菌数の低減を示した。腸内細菌科菌群は処理前の肝臓から 0～2.33 log/g、大腸菌は 0～2.42log/g 検出されたが、高圧処理により全検体検出限界以下となった。腸内細菌科菌群及び大腸菌について TEMPO を用いた結果は、ペトリフィルムを用いた結果とほぼ同等であった。

## 4.2. 高圧処理後の加温処理が牛肝臓の肉質変化に及ぼす影響

4.1. と同じ条件で牛肝臓の高圧処理を実施したところ、硬度の指標である最大破断点 (N 値) は未処理検体では 7.54 であったが、42℃1 時間の加温処理のみでは 6.28、300MPa10 分間の高圧処理のみでは 5.16 となっており、柔らかくなる傾向が見られた。一方、高圧処理後に加温処理を行った検体では、N 値は 6.18 となり、高圧処理単独よりも硬化する傾向を示したが、未処理検体よりも柔らかい傾向を示した。色調変化については、42℃での加温処理により、明るさの指標である L 値が 23.3 から 26.6 に増加したものの、赤みの指標である a 値は微減し、黄色みの指標である b 値も 4.9 から 3.9 に減少した。一方、300MPa10 分の高圧処理により、L 値は 29.7、a 値は 7.5、b 値は 7.3 に上昇し、未処理検体と比較して明

るい色調となった。更に、高圧処理後に加温処理を行った検体では、L 値が 33.6、a 値が 7.0、b 値が 8.6 となり、肉眼による観察でも、高圧処理のみを行った検体より白みが強くなる傾向が見られた。

## D. 考察

と畜場では、腹腔から摘出された肝臓をと畜検査員が検査し、廃棄又は部分廃棄(病変部を削除)と判断する。その後、内臓取扱業者によって、一旦冷蔵庫に保管され、通常、半日～1 日後にと畜場から出荷される。しかし、牛肝臓は、重量 6～8kg、厚み 5～10 cm という実質臓器であり、さらに摘出直後の肝臓内部温度は 38～40℃もあるため、冷蔵温度では急激な温度の低下を期待することができず、肝臓内部に細菌污染があった場合には増殖する可能性がある。

実際、衛生指標菌のうち、糞便汚染指標である腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が肝実質より検出された個体数はそれぞれ 16 頭 (22.9%)、19 頭 (27.1%)、8 頭 (11.4%) であり、前年度の衛生的な摘出及び速やかな試験を実施した際に比べて、検出率の高い傾向であった。この結果から、指標菌成績を参照しつつ各施設での処理工程を整理し、整形後の速やかな洗浄冷却や包装、低温管理の徹底等を行うことが、摘出以降の交叉汚染や細菌増殖を制御する上で重要な衛生管理項目と考えられた。なお、腸内細菌科菌群は 8 頭の胆汁から検出され、うち 6 頭の肝臓内部からも検出されたが、胆汁で陰性の 62 個体のうち、52 個体は肝臓内部でも同菌陰性であり、陽性となった場合にも最大菌数は 1 検体を除き、概ね 10<sup>1</sup> CFU/g オーダーであり、胆汁中の腸内細菌



科菌群検査は、肝臓内部の同指標菌の高濃度汚染の探知に有用と考えられた。保管中の温度管理に関しては、肝臓を3つの大きさに分けて温度変化を計測したところ、予想どおり、小さなブロックにするほど、温度低下速度は速くなるが、その速度には底面の面積よりも厚さが大きく影響していることが明らかとなった。厚さを8 cmにした場合、冷凍庫（-30℃）保管で20℃（サルモネラがミューラー・ヒントン液体培地及び胆汁で増殖がほぼ認められない（5時間培養でも10倍以下）温度）まで2時間以内に達成することができた。この肝臓の厚さは、ほとんどの肥育牛及び交雑種の肝臓左葉をカバーできる。

胆嚢中の胆汁については、肝臓内部の腸内細菌科菌群汚染の探知に有用である反面、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸0157は胆汁中で増殖できること、約1割の胆汁から高濃度の腸内細菌科菌群が分離されたことから、肝臓内部汚染の拡大防止には、肝臓から胆嚢を可能な限り早く衛生的に切除する必要があると考えられた。

放射線照射による殺菌に関しては、商業用施設で実施した場合でも、肝臓の厚さが8 cm以下であれば線量測定の不確かさを考慮しても、サルモネラの5桁低減に必要な最小線量（8.2 kGy～10 kGy）で照射を達成できる可能性が示された。ただし、多数の肝臓試料を複数のトートボックスに装填する場合には、個々の試料の形体や比重をできるだけ揃えて再現良くトートボックス内の定位置に装填する工夫が必要と判断された。

高圧処理による殺菌に関しては、昨年度の条件（高圧処理を3回反復する際の温

度を42℃に設定）と比べ、今年度実施した高圧処理後に加温処理を行う条件の方が肝臓の肉質変化は抑制されていたものの、未処理の検体とは大きく異なる色調を示したことから、生食用の牛肝臓を十分なレベルで殺菌しつつ、肉色の白化を防ぐのは困難と考えられた。

## E. 結論

- ・前年度の衛生的な摘出及び速やかな試験を実施した場合と比べ、衛生指標菌の検出率は高い傾向であった。
- ・胆汁中の腸内細菌科菌群検査は、肝臓内部の同指標菌の高濃度汚染の探知に有用と考えられた。
- ・サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌0157は胆汁で増殖可能であった。
- ・商業用施設でも、牛肝臓に対してサルモネラの5桁低減に必要な殺菌できる線量（8.2 kGy～10 kGy）を照射できる可能性が示された。
- ・腹腔から摘出後の肝臓は、細菌汚染拡大防止のため、胆嚢を速やかに切除し、小分けした上で、冷凍することが望ましい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 川崎 他、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、65（2018）259-263.
- 2) Susumu Kawasaki, Mie Saito, Mari Mochida, Fia Noviyanti, Hajime Seito, Setsuko Todoriki, Inactivation of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella* Enteritidis in raw beef liver by gamma

irradiation, Food Microbiology 78  
(2019) 110- 113.

## 2. 学会発表

- 1) 岡田由美子、鈴木穂高、吉田麻利江、荻原博和. 高圧処理による畜産食品中の食中毒原因菌の不活化. 第 161 回日本獣医学会学術総会. 2018. 9. 12 (つくば市)
- 2) Y Okada, H Suzuki, Y Momose, H Ogihara. Inactivation of foodborne pathogens by

HHP treatment in meats. 10<sup>th</sup>  
International Conference on HPBB.  
2018. 9. 19-20. (沼津市)

- 3) 岡田由美子、鈴木穂高、吉田麻利江、百瀬愛佳、荻原博和. 高圧処理を用いた食肉中の食中毒菌不活化の検討. 第 45 回日本防菌防黴学会. 2018. 11. 14 (江戸川区)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成30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
	大窪富士子	岩手県食肉衛生検査所
	白木 豊	岐阜県中央食肉衛生検査所
	西部尚史	岐阜市食肉衛生検査所
	戸嶋章湖	兵庫県食肉衛生検査センター
	清島綾子	福岡県食肉衛生検査所
	安達俊輔	島根県食肉衛生検査所

**研究要旨：**これ迄、複数のと畜場にて内臓摘出段階から可能な限り衛生的に採材を行った牛肝臓等における細菌汚染部位及びその局在性等に関する知見を集積し、肝臓内部（肝実質）には一定の比率及び量で細菌汚染を認める状況を確認した。本年度は、通常の解体加工処理を経て、出荷直前の牛肝臓等での細菌汚染状況について工程管理を含めて調査した。平成30年6月～9月（夏季）及び同年12月～31年2月（冬季）に、計7自治体が管轄する食肉センター（自治体A～G）でとさつ・解体された計73頭の肉用牛由来の検体を対象とした。このうち、自治体A・F管轄下の施設で採材された計3頭分の肝臓は胆管炎、出血斑、肝膿瘍を呈していたため、健常検体から除外し、計70頭分の牛肝臓表面、胆嚢内胆汁、肝実質（右葉、左葉各2部位）の計6部位を対象に衛生指標菌の定量試験、及び腸管出血性大腸菌O157/O26/O111及びサルモネラ属菌の定性試験を行った。二種の病原菌は全てで分離培養陰性であった。衛生指標菌のうち、糞便汚染指標である腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が肝実質より検出された個体数はそれぞれ16頭（22.9%）、19頭（27.1%）、8頭（11.4%）であり、前年度の衛生的な摘出及び速やかな試験を実施した際に比べて高い傾向であった。肝実質での腸内細菌科菌群の最大検出菌数は $7.1 \times 10^4$ CFU/gであった。同指標菌は8頭の胆汁から検出され、うち6頭の肝実質からも検出されたが、胆汁で陰性の62個体のうち、52個体は肝実質でも同菌陰性であり、陽性となった場合にも最大菌数は1検体を除き、概ね $10^1$ CFU/gオーダーであった。以上の知見より、胆汁中の腸内細菌科菌群検査は、肝実質中での同指標菌の高濃度汚染の探知に有用と考えられた。併せて、指標菌成績を参照しつつ各施設での処理工程を整理し、整形後の速やかな洗浄冷却や包装、低温管理の徹底等が摘出以降の交叉汚染や細菌増殖を制御する上で重要な衛生管理項目と考えられた。こうした衛生対策の普及推進と効果の検証が今後の課題と思われる。

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、牛肉及び牛内臓肉に関する細菌汚染調査等が進められ、牛の肝臓内部（肝実質）

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は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。

こうした背景を念頭に、今後、生食用牛肝臓の提供を再開することについて検討を行う上では、細菌汚染低減目標値の設定が必要不可欠である。そのためには、牛肝臓実質等での細菌汚染実態について、各施設での衛生管理実態や季節性等も考慮に入れつつ、最適かつ応用可能な微生物汚染低減対策を講じることが必須の要件となる。牛のとちく・解体を行う食肉センター等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ものの、多様性に富む点も見受けられる。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、本分担研究では、一年目から二年目にかけて、とさつ直後に

可能な限り肝臓を衛生的にとたいより摘出し、これを対象とした微生物試験を行うことで牛肝臓等における細菌の定量的分布に関する知見を集積してきた。結果として牛肝実質内で検出される腸内細菌科菌群等の最大値は $10^4$ オーダー/gに留まっており、本研究班の別課題として検討が進められている微生物汚染低減手法の評価結果を踏まえると、理論上、同指標菌が検出されない状況にまで低減し得ると思われる結果を得た。

一方で、牛肝臓等の解体加工並びに保存工程等は、施設間で多様性がみられることを踏まえ、本年度は、計7施設にて通常処理され、出荷前の冷蔵保存状態にある牛肝臓を対象として、衛生指標菌の定量試験及び主要病原細菌である腸管出血性大腸菌並びにサルモネラ属菌の定性試験を実施した。加えて、比較的高い糞便汚染指標菌の汚染を受けた個体がみられた施設を対象に製造加工工程に関する情報を收集整理し、細菌汚染実態の背景を考察したので報告する。

## B. 研究方法

本研究では、計7自治体（A～G）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。

(iii) 生体検査において異常を認めない個体であること。

(iv) 通常の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。

(v) 検査時において胆嚢に損傷がなく、胆汁が十分に満たされていること。

(vi) (表面及び実質については) 事業者により加工・冷蔵保管され、出荷直前の肝臓であること。

その後、採材検体(部位)については、速やかに 10℃以下の温度帯で検査室に搬送し、次項に示す手順に従い、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することとした。

## 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1~2)。

### 3) 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。

### 4) 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。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。この際、滅菌済メス及びピンセットは1面切るごとに、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(AC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100μl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*遺伝子及びO157, O111, O26特異的遺伝子についてPCR法により検出した。これらの遺伝子について陽性が認められた場合には、通知法にて示される選択分離培養法により対象菌の検出を試みた。

### 6. 菌叢解析

高い衛生指標菌数を示した代表検体につ

いて、実質等に分布する細菌叢を探知する目的で、16S rRNA 菌叢解析を行った。項4.で抽出したDNAを鋳型として、16S rRNA V5-V6部分配列をPCR増幅し、タグ標識後、複数検体を等量混合して、Ion CHEFを用いたライブラリー作成を行った。その後、Ion PGMを用いて塩基配列データを取得した。データ解析には主としてCLC Geomic Workbench及びMetagenome @KINを用いた。

## C. 結果

7自治体(A~G)の協力を得て、各食肉センターでとちく解体された計73頭の牛肝臓検体を採取した。これらのうち、3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

供試検体(70頭×6部位=420検体)について、PCRスクリーニング試験により、遺伝子検出を行ったところ、自治体Eの施設で冬季に対象とした1頭の表面及び実質右葉外側の2検体、及び自治体Fの施設で夏季に対象とした1頭の牛肝臓実質左葉2検体でVT遺伝子が検出され、うち1検体についてはO157特異的遺伝子も検出されたが、選択分離培養では陰性を示した。

### 2. 衛生指標菌の検出状況

#### 1) 指標菌別成績(表1、2及び図10)

##### (i) 細菌数

牛肝臓表面拭取り検体は、1頭を除く全てが陽性を示し、その平均値は $4.9 \times 10^4$ CFU/100cm<sup>2</sup>(最小値:  $2.0 \times 10^1$

CFU/100cm<sup>2</sup>、最大値：1.1×10<sup>6</sup>CFU/100cm<sup>2</sup>であった。

胆汁については、計15頭が陽性を示し、最大値は3.6×10<sup>7</sup>CFU/mLであった。

実質左葉・右葉では、それぞれ36頭（陽性率51.4%）および39頭（同55.7%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、9.6×10<sup>4</sup>CFU/g、陰性も含めた全体の平均値は1.1×10<sup>3</sup>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、40頭では腸内細菌科菌群が検出され（57.1%）、最大値は2.9×10<sup>5</sup>CFU/100cm<sup>2</sup>であった。また、夏季と冬季の陽性率はそれぞれ68.6%及び45.7%と夏季で高い傾向にあった。

胆汁では8頭が陽性（陽性率10.0%）となり、最大値は1.1×10<sup>7</sup>CFU/mLであった。

実質は、左葉のみ陽性が3頭（最大値6.2×10<sup>2</sup>CFU/g）、右葉のみ陽性が5頭（最大値8.0×10<sup>1</sup>CFU/g）、両葉とも陽性が8頭（最大値7.1×10<sup>4</sup>CFU/g）であった（表2、図10）。

#### (iii) 大腸菌群

表面拭き取り検体では、35頭から大腸菌群が検出され（46.4%）、最大値は2.3×10<sup>5</sup>CFU/100cm<sup>2</sup>であった。また、夏季・冬季の陽性率は62.9%及び37.1%と、腸内細菌科菌群と同様の傾向を示した。

胆汁は、5頭が陽性となり（陽性率7.1%）、最大値は8.0×10<sup>6</sup>CFU/mLであった。

実質では、左葉のみ陽性が2頭（最大値2.9×10<sup>3</sup>CFU/g）、右葉のみ陽性が8頭（最大値1.6×10<sup>2</sup>CFU/g）、両葉とも陽性が9頭（最大値3.4×10<sup>4</sup>CFU/g）であった。

#### (iv) 大腸菌

表面拭き取り検体は24頭で大腸菌陽性となり、最大値は2.3×10<sup>5</sup>CFU/100cm<sup>2</sup>であった。季節別では夏季が15頭、冬季が9頭陽性を示した。

胆汁では6頭が陽性となり（陽性率8.6%）、最大値は6.8×10<sup>6</sup>CFU/mLであった。

実質検体では、左葉のみまたは右葉のみ陽性が各2頭（最大値2.9×10<sup>2</sup>CFU/gまたは6.0×10<sup>1</sup>CFU/g）、両葉とも陽性が4検体（最大値8.6×10<sup>4</sup>CFU/g）であった。

## 2) 施設別の成績比較（図3-10）

### (i) 自治体A（図3）

自治体Aでは夏季5頭分、冬季5頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約70%であった。検査終了後の肝臓は、とちく作業員により切除され、清浄なプラスチックコンテナに入れて内臓処理事業者に渡されていた。同事業者では専用の刀を用いて整形し（使用後の刀はバケツのため水で洗浄）、オーバーフロー式の洗浄槽内で洗浄・冷却していた。その後、一頭分ごとにビニール袋に入れ、金属探知機を通して異物検査を行い、3℃以下の冷蔵庫内に入れ、1～2頭分毎に保管用バット上で平均18～24時間保管していた。

計10頭分の牛肝臓等のうち、1頭分については内部に肝膿瘍が認められたため、廃棄対象とし、残り9頭分を正常検体として検査成績を集計した。

胆汁については、9頭分のうち、1頭分のみで腸内細菌科菌群（1.5×10<sup>7</sup>CFU/mL）、大腸菌群（1.1×10<sup>7</sup>CFU/mL）、大腸菌（6.8×10<sup>6</sup>CFU/mL）が検出された。肝実質から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検

出されたものは7頭分に留まり、それぞれの最大値は特定の個体由来の検体に局限していた（ $1.6 \times 10^2 \text{CFU/g}$ 、 $2.3 \times 10^2 \text{CFU/g}$ 、 $2.3 \times 10^2 \text{CFU/g}$ ）。

肝臓表面からは、一般細菌数が9頭分全から検出され、その平均値が $6.6 \times 10^4 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ であったほか、腸内細菌科菌群は計5頭分より検出され、陰性検体を含む平均値は $1.2 \times 10^2 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ であった。

#### (ii) 自治体 B (図 4)

自治体 B では夏季5頭分、冬季5頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約66%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され、検査を受けていた。その後、同レーン上に懸架された状態で処理室に移動され、水で洗浄冷却後、まな板上で整形後、一頭分ずつビニール袋に入れ、氷を敷き詰めた専用箱に入れて6頭分毎に $4.4^\circ \text{C}$ 以下の冷蔵庫内に移送・保管（約18時間）されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約30分であった。

胆汁については、1頭分のみで腸内細菌科菌群（ $8.1 \times 10^5 \text{CFU/mL}$ ）、大腸菌群（ $2.5 \times 10^3 \text{CFU/mL}$ ）、大腸菌（ $2.1 \times 10^4 \text{CFU/mL}$ ）が検出された。

肝実質から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検出されたものは1頭分に留まり、それぞれの最大値は $6.2 \times 10^2 \text{CFU/g}$ 、 $3.0 \times 10^1 \text{CFU/g}$ 、 $2.9 \times 10^2 \text{CFU/g}$ であった。

肝臓表面からは、一般細菌が10頭分全から検出され、平均値が $7.2 \times 10^3 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ であったほか、腸内細菌科菌群は3頭分よ

り検出された（陰性検体を含む平均値は $1.1 \times 10^1 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ ）。

#### (iii) 自治体 C (図 5)

自治体 C では夏季5頭分、冬季5頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約98%であった。牛肝臓は摘出後、速やかに検査台上で検査を受け、とちく検査員により胆嚢が切除された後、一頭分ずつプラスチック製箱に入れて、内臓処理に供されていた。同加工施設での製造加工実態については回答が得られなかった。

胆汁については、全10頭分で一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌が検出されなかった。

肝実質から腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌は何れの個体からも検出されず、1頭分のみで一般細菌が検出された（ $4.6 \times 10^3 \text{CFU/g}$ ）。

肝臓表面からは、一般細菌が9頭分全から検出され、その平均値は $5.4 \times 10^3 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ であった。また、腸内細菌科菌群は3頭分より検出され、陰性検体を含む平均値は $2.5 \times 10^2 \text{CFU}/100 \text{cm}^2$ であった。

#### (iv) 自治体 D (図 6)

自治体 D では夏季5頭分、冬季5頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約58%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され、検査を受けていた。その後、同レーン上に懸架された状態で処理室に移動後、まな板上で専用器具を用いて整形し、流水洗浄していた。一頭分ずつ清浄なビニール袋に入れ、他臓器と区



分けできるよう、専用箱に入れて 10℃以下の冷蔵庫内に移送し、臓器別に区分できるよう、カゴに分別して保管されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 2.5 時間であった。

胆汁については、2 頭分で腸内細菌科菌群 ( $3.6 \times 10^5$ ,  $5.7 \times 10^5$  CFU/mL) 及び大腸菌群 ( $1.6 \times 10^5$ ,  $2.9 \times 10^5$  CFU/mL) を認めたほか、1 頭分で大腸菌 ( $4.8 \times 10^4$  CFU/mL) が検出された。

肝実質から腸内細菌科菌群は 3 頭分より検出され、その最大値は右葉内側で検出された  $3.7 \times 10^4$  CFU/g であった。大腸菌群は 2 頭分、大腸菌は 1 頭分より検出され、最大値はそれぞれ  $3.4 \times 10^4$  CFU/g,  $7.2 \times 10^2$  CFU/g であった。

肝臓表面からは、一般細菌が 10 頭分全てから検出され、平均値が  $8.8 \times 10^4$  CFU/100cm<sup>2</sup> であったほか、腸内細菌科菌群は 5 頭分より検出された（陰性検体を含む平均値は  $2.9 \times 10^4$  CFU/100cm<sup>2</sup>）。

#### (v) 自治体 E (図 7)

自治体 E では夏季 5 頭分、冬季 5 頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するところ、検査合格率は約 38% であった。牛肝臓はとたいより摘出後、速やかに吊下げレーンで運搬され、検査を受け、懸吊状態でビニール袋を全体に被せ、内臓処理室に搬送されていた。その後、レーンから外し、流水洗浄および氷を用いた冷却が行われることもあるとのことであった。最終的に、一頭分ずつ清浄なビニール袋に入れ、他臓器と区分できるよう、専用箱に入れて 10℃以下の冷蔵庫内に移送し、臓器別に区分できるよう、カゴに分別して保管

されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 10 分～1 時間であった。

胆汁については、2 頭分で腸内細菌科菌群 ( $1.0 \times 10^0$ ,  $3.5 \times 10^5$  CFU/mL) 及び大腸菌群 ( $2.9 \times 10^5$  CFU/mL) を認めたほか、1 頭分で大腸菌 ( $2.1 \times 10^4$  CFU/mL) が検出された。

肝実質から腸内細菌科菌群は 4 頭分で検出され、その最大値は  $2.3 \times 10^3$  CFU/g であった。また、大腸菌群は 9 頭分で検出され、最大値は  $2.7 \times 10^4$  CFU/g であった。大腸菌は 2 頭分で検出され、その最大値は  $3.0 \times 10^3$  CFU/g であった。

肝臓表面からは、一般細菌が 10 頭分全てから検出され、平均値は  $3.5 \times 10^4$  CFU/100cm<sup>2</sup> であったほか、腸内細菌科菌群は 5 頭分より検出された（陰性検体を含む平均値は  $4.7 \times 10^2$  CFU/100cm<sup>2</sup>）。

#### (vi) 自治体 F (図 8)

自治体 F では夏季 4 頭分、冬季 6 頭分の牛肝臓等を対象に検討した。うち、冬季の 1 頭分については、検査時に異常（出血斑）を認めたため、検討対象から除いた。

同施設での肝臓に関するところ、検査合格率は約 80% であった。牛肝臓はとたいより摘出後、肺、心臓、脾臓と共に専用のベルトコンベアーに乗せられ、検査を受けた後、滑り台を通じて内臓処理室へ移送されていた。その後、赤物専用作業台上で流水洗浄し、胆嚢を除去後、酸性電解水で肝臓表面を流水洗浄してから、包装せず、氷を敷き詰めた専用カゴに入れ、約 30 分室内保管後、カゴ全体を覆う専用シートをかぶせた状態で 10℃以下の冷蔵保管室へ移送し、臓器別にカゴ単位で区分化しているものの、胃腸

が入ったカゴが一番上に、その下に他臓器が重ねられて一頭分ずつ縦に管理されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 30 分～1 時間であった。

胆汁は、夏季の 2 頭分で腸内細菌科菌群 ( $5.3 \times 10^4 \text{CFU/mL}$  または  $1.2 \times 10^7 \text{CFU/mL}$ ) を認め、うち 1 頭分は大腸菌群及び大腸菌も陽性であった。

肝実質から腸内細菌科菌群は 3 頭分で検出され、その最大値は  $7.1 \times 10^4 \text{CFU/g}$  であった。また、大腸菌群及び大腸菌はそれぞれ 4 頭または 3 頭より検出され、最大値は  $8.6 \times 10^4 \text{CFU/g}$  または  $8.6 \times 10^4 \text{CFU/g}$  であった。

肝臓表面からは、一般細菌が 9 頭分全てから検出され、平均値は  $3.2 \times 10^5 \text{CFU/100cm}^2$  であったほか、腸内細菌科菌群は 8 頭分より検出された（陰性検体を含む平均値は  $4.1 \times 10^4 \text{CFU/100cm}^2$ ）。

同施設では特に肝臓表面の糞便汚染指標菌数が夏季に高くなる傾向が認められた。

#### (vi) 自治体 G (図 9)

自治体 G では夏季 6 頭分、冬季 6 頭分の牛肝臓等を対象に検討した。同施設での肝臓に関するとちく検査合格率は約 46% であった。牛肝臓はとたいより摘出後、速やかに専用バットに入れられ、スロープ上を滑らせた後、検査を受けた。胆嚢を除去後、ビニール袋に入れられ、ステンレス容器に格納され、心臓、テール、横隔膜とともに、内臓処理室へ搬送された。その後、肝門脈付近の脂肪・リンパ節等を整形し、100ppm 次亜塩素酸ナトリウムを添加した氷水中で約 3 分間浸漬冷却したものを清浄なビニール袋に入れ、密封したものを氷水中に浸漬し、更に冷却を行った。金属探知機を通し

て異物検査を行った後、 $10^\circ\text{C}$  以下の冷蔵庫内に移送し、臓器別に区分できるよう、カゴに分別して保管されていた。検査合格から冷蔵庫内への移送までに要する時間は約 4 時間であった。

胆汁については、全 12 頭分で腸内細菌科菌群、大腸菌群、及び大腸菌は陰性であった。

肝実質から腸内細菌科菌群は 1 頭分のみで、大腸菌群は 2 頭分で検出され、最大値はいずれも  $1.0 \times 10^1 \text{CFU/g}$  であった。大腸菌は全 12 頭分で認められなかった。

肝臓表面からは、一般細菌が 12 頭分全てから検出され、平均値は  $2.8 \times 10^4 \text{CFU/100cm}^2$  であったほか、腸内細菌科菌群は 11 頭分より検出され、陰性検体を含む平均値は  $3.2 \times 10^2 \text{CFU/100cm}^2$  であった。大腸菌群は 7 頭分で、大腸菌は 4 頭分で検出され、陰性検体を含む平均値はそれぞれ  $5.2 \times 10^1 \text{CFU/100cm}^2$ 、 $1.3 \times 10^1 \text{CFU/100cm}^2$  であった。

### 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

胆汁中で腸内細菌科菌群陽性を示した個体 (8 頭) では肝実質両葉で同指標菌の分布を認めた (表 2-1)。一方、胆汁中で同指標菌陰性の個体 (62 頭) のうち、52 頭は肝実質に同指標菌を認めず、2 頭では左葉のみ、5 頭では右葉のみ、3 頭は両葉に同指標菌を認めた (表 2-1)。しかしながら、肝実質における同指標菌数は最大でも  $7.1 \times 10^4 \text{CFU/g}$  であり、概ね  $10^1$  オーダー  $\text{CFU/g}$  に留まっていた (表 2-2)。

これらのうち、肝実質から  $10^3 \text{CFU/g}$  以上の腸内細菌科菌群を認めた計 5 個体について

て、胆汁中の同指標菌数を整理した結果、1 個体（自治体 B の冬季 1 頭分；胆汁  $8.1 \times 10^5$  CFU/mL，肝実質  $6.2 \times 10^2$  CFU/g）が陰性であったほかは、 $4.2 \times 10^3 \sim 5.7 \times 10^5$  CFU/mL と比較的高い水準で分布を示した（表 3）。

以上の成績より、胆汁中に同指標菌の高濃度汚染を認める個体では、肝実質においても同指標菌の高濃度汚染を受ける傾向が認められた。

#### 4. 胆汁または肝実質から $10^3$ CFU/g または mL 以上の腸内細菌科菌群が検出された代表個体における菌叢解析（図 11）

胆汁及び肝実質内において多くの腸内細菌科菌群を認めた代表 3 検体（F-VI，D-VI，E-IV）について各部位の構成菌叢を解析したところ、何れも大腸菌が共通した優勢菌叢として、表面、胆汁のほか、実質においても認められた。特に、個体 D-VI での大腸菌占有率は実質でも高値を示し、右葉では 80% を超える高値を認めた。

#### D. 考察

本研究では、計 7 自治体（A～G）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）による検査を経て、通常処理され、出荷前の状態にある牛肝臓等における細菌汚染実態を検討した。

乳肉食品の成分規格、並びにとちく場等での衛生管理等に、国際的に糞便汚染指標として広く用いられる腸内細菌科菌群は計 6 施設・16 頭由来肝実質より検出され、その最大値は  $7.1 \times 10^4$  CFU/g であった。腸内細菌科菌群が肝実質で認められなかった 1 施

設（自治体 C）の検体では大腸菌群、大腸菌も認められず、糞便汚染が実質内で制御されている状況にあると考えられた。

一方、高率に肝実質内に腸内細菌科菌群を認めた自治体 D の施設（5/10、陽性率 50%）及び自治体 E の施設（4/10、40%）では、共に摘出された後、肝臓等は検査を受け、処理室へ吊り下げ式レーンを通じて搬送されていたが、自治体 D の施設では検査から保管に至る時間が約 2.5 時間を要していたほか、自治体 E の施設では洗浄を行わず、レーン上で包装を行い、そのまま保管室へ移送する場合もあるとのことであった。他施設で比較的速やかな洗浄冷却が行われていたことを踏まえると、自治体 D 及び E の施設では肝実質内部の温度は相対的に長時間をかけて冷蔵温度帯へ移行したため、この間に腸内細菌科菌群が増殖を呈した結果とも目される。このことは、肝臓等の衛生確保にあたっては速やかかつ十分な洗浄冷却が必要であることを改めて示すものと考えられる。

加えて、自治体 F の施設では、肝臓等を包装せずに処理室内で一定時間氷を敷き詰めたバット上に保管し、他の臓器と共に一頭分ずつを縦に重ねた形で冷蔵室へ移送保管している点も衛生管理上の留意点として挙げられた。すなわち、当該施設の内臓処理室内では水等を介した交叉汚染の可能性も考慮することが必要であり、更に洗浄冷却後の肝臓については、速やかに包装を行い、冷却させることが微生物汚染及び増殖危害の低減に資するものと思われる。また、同施設では、臓器別に区分を行ってはいったが、胃腸管を一番上段のカゴに置いており、これらに由来するドリップが肝臓等を含む

下段のカゴへ落下し、間接的な交叉汚染を保存中に招きうることも想定された。

胆汁及び肝実質内において多くの腸内細菌科菌群を認めた代表3検体の構成菌叢を解析した結果、何れも大腸菌が共通した優勢菌叢として、表面、胆汁、実質で認められた。肝実質内への細菌侵入に係る原発的経路としては、胆管を介した経路のほか、肝門脈を介した血行性の経路も想定されており、その解明には基礎研究も含めた更なる検討が必要と思われる。一方で上記菌叢解析の結果は、細菌が肝実質内へ侵入した後の広範な分布を齎す媒体として胆汁が大きく関与することを示唆していると考えられる。実際に、胆汁酸に対しては、多くのグラム陰性菌が抵抗性を示し、2012年の生食提供禁止措置が取られる迄、牛肝臓の生食により多発していた代表的食中毒菌であるカンピロバクターも胆汁内で生存・増殖を示すとの報告もある。

従って、とたいからの摘出時をはじめ、その後の整形に至る過程では、胆汁の漏出が極力生じないように配慮する必要がある。また、胆汁中の腸内細菌科菌群を検査することにより、肝実質内で高濃度の腸内細菌科菌群汚染を受けた牛肝臓をスクリーニングすることも意義があるものと考えられる。

今後、牛肝臓を仮に生食等に供することを検討する際には、これらに加えて、最終製品においても腸内細菌科菌群陰性を確認するための微生物検査は欠かすことができない。更に、十分な微生物汚染を低減させるための工程管理について、確実な検証と結果の記録を国際整合の観点から捉えることも必須の項目と思われる。

## E. 結論

計70頭分の通常処理を受け、出荷前にある健常牛肝臓等について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分離培養陰性となった。

- ・牛肝実質における腸内細菌科菌群の最大菌数は $7.1 \times 10^4$ CFU/gであった。

- ・ $10^3$ CFU/g以上の腸内細菌科菌群が肝実質で検出された個体由来胆汁中には高い割合で同指標菌が検出されたことから、胆汁における同指標菌の検査は、肝臓実質における同指標の汚染を探知するスクリーニング法として有用であることが示唆された。

- ・工程管理にあたっては、整形後の迅速かつ適切な洗浄冷却及び包装の徹底を図ると共に、冷蔵保存に至るまでの区分管理の徹底が重要な項目として抽出された。

## F. 研究発表

### 3. 論文発表

なし

### 4. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

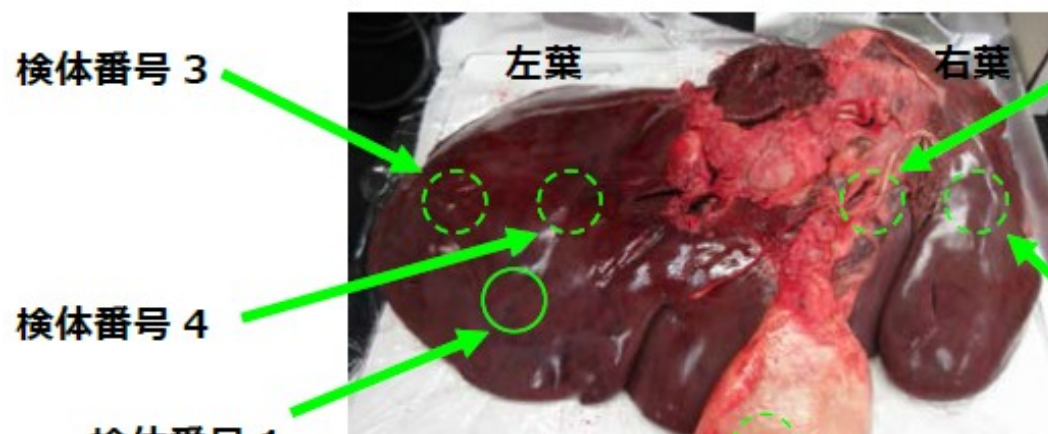


図 1. 採材部位

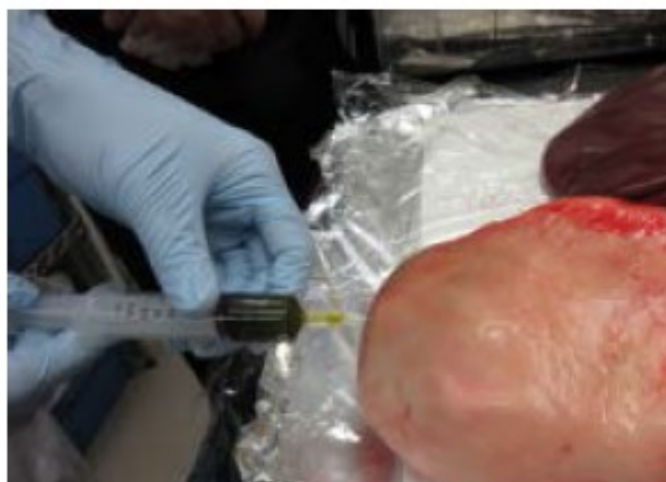


図 2. 胆嚢内胆汁の採材

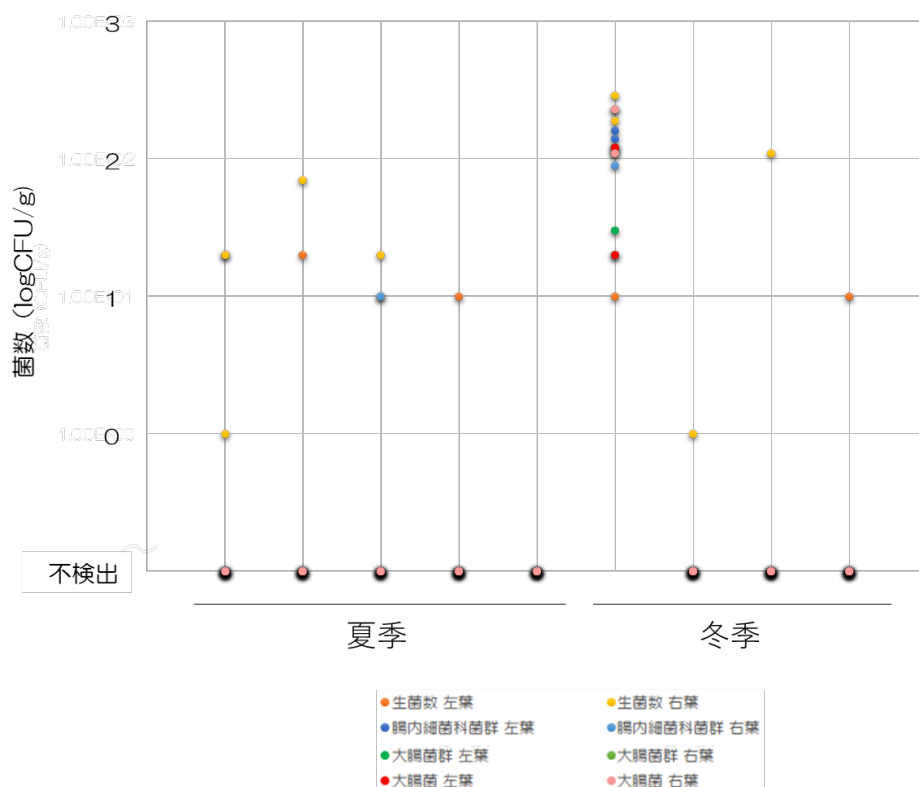


図 3. 自治体 A 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況.

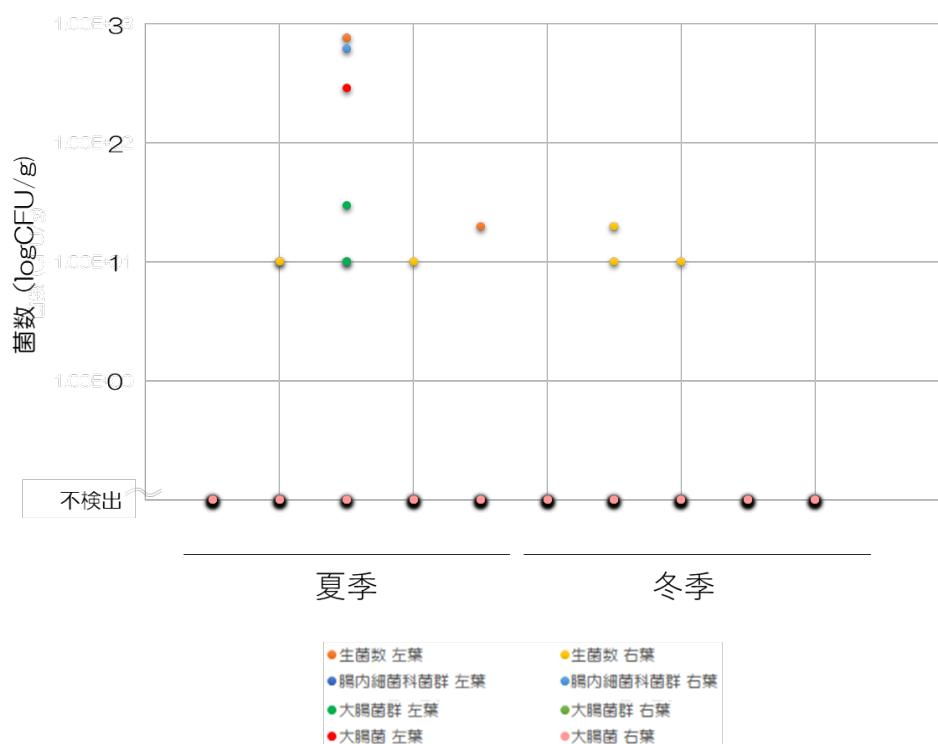


図 4. 自治体 B 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況

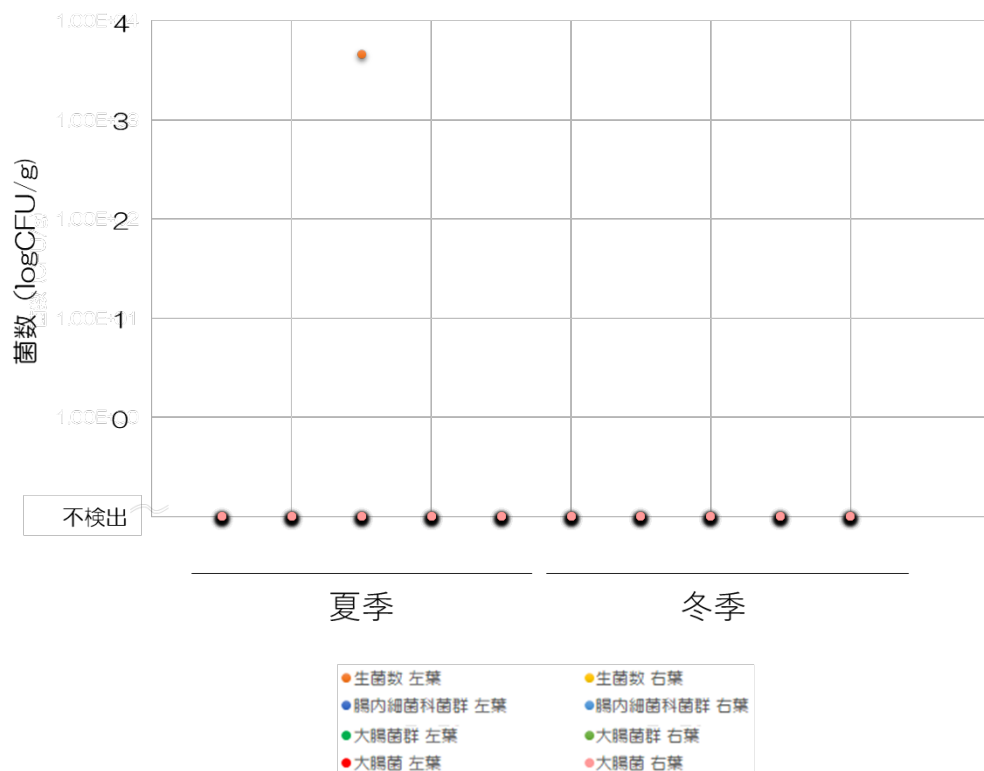


図 5. 自治体 C 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況

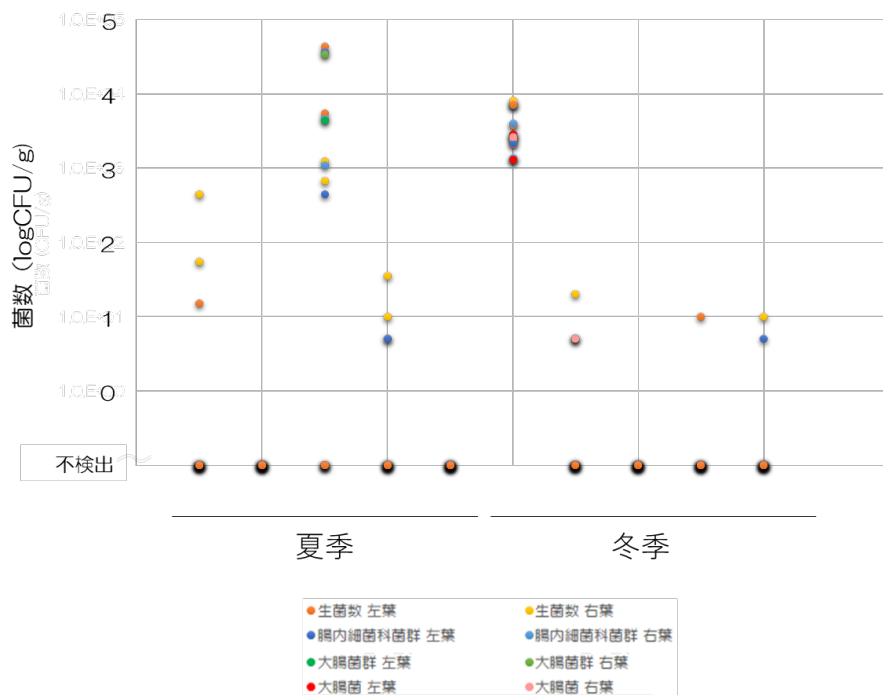


図 6. 自治体 D 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況

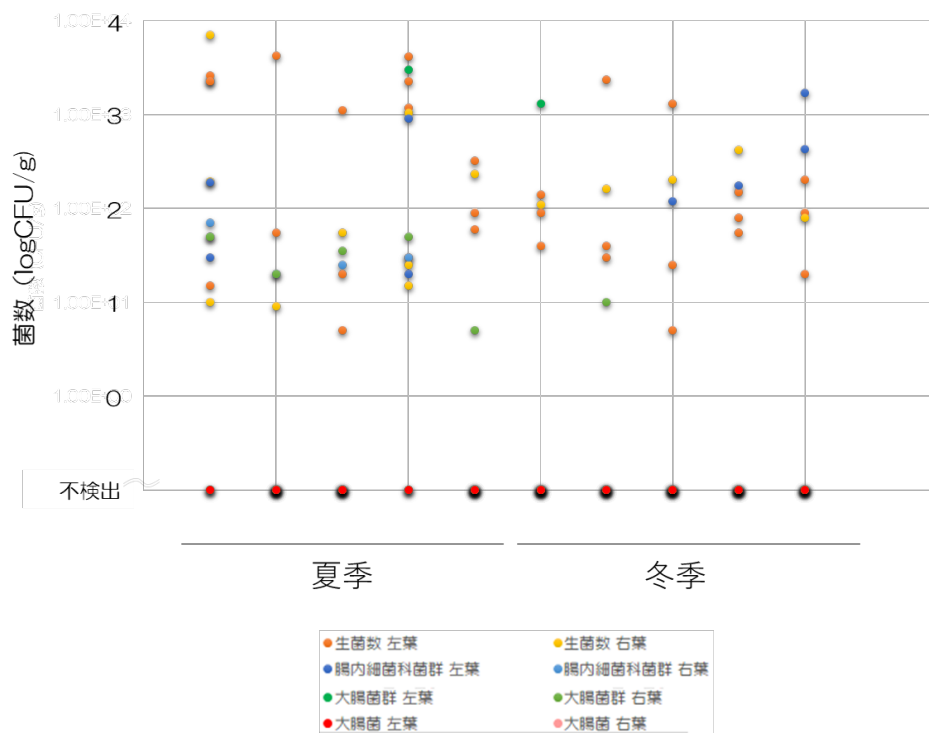


図 7. 自治体 E 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況.

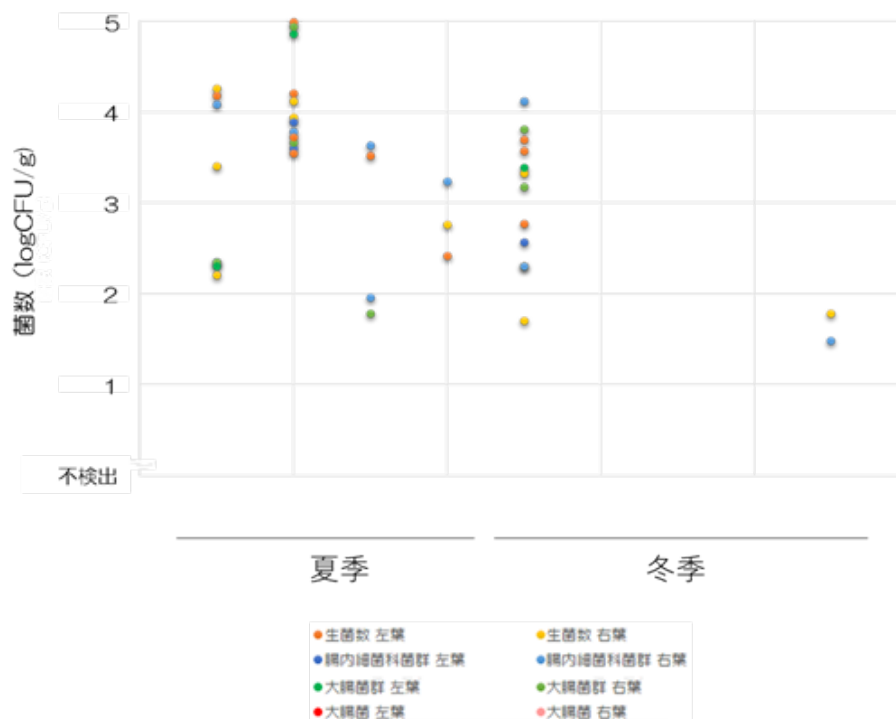


図 8. 自治体 F 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況



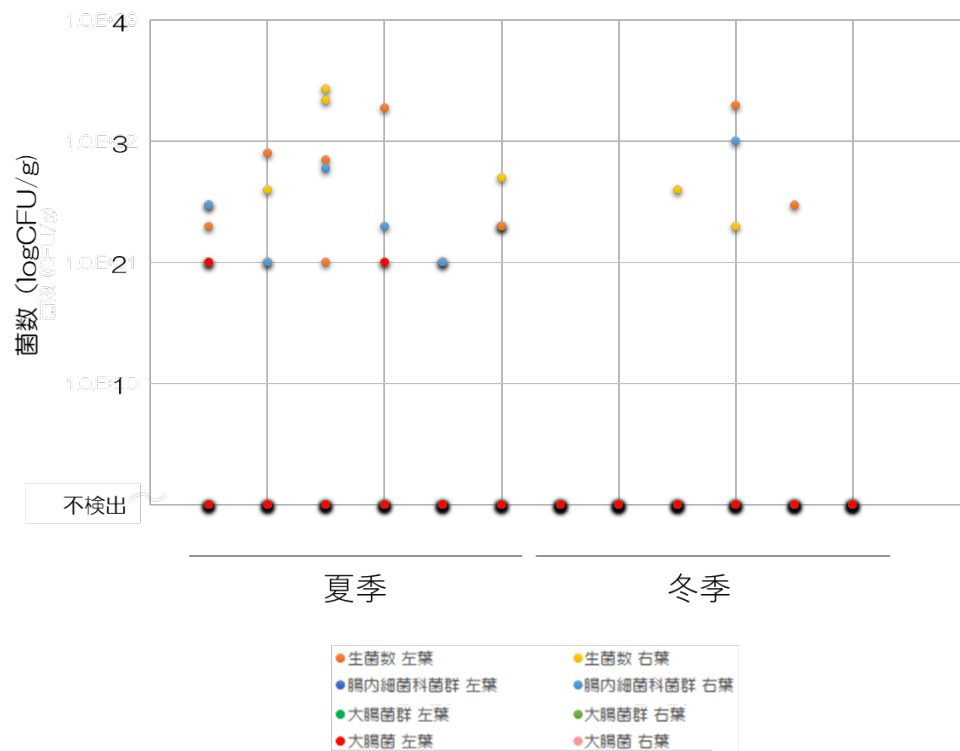
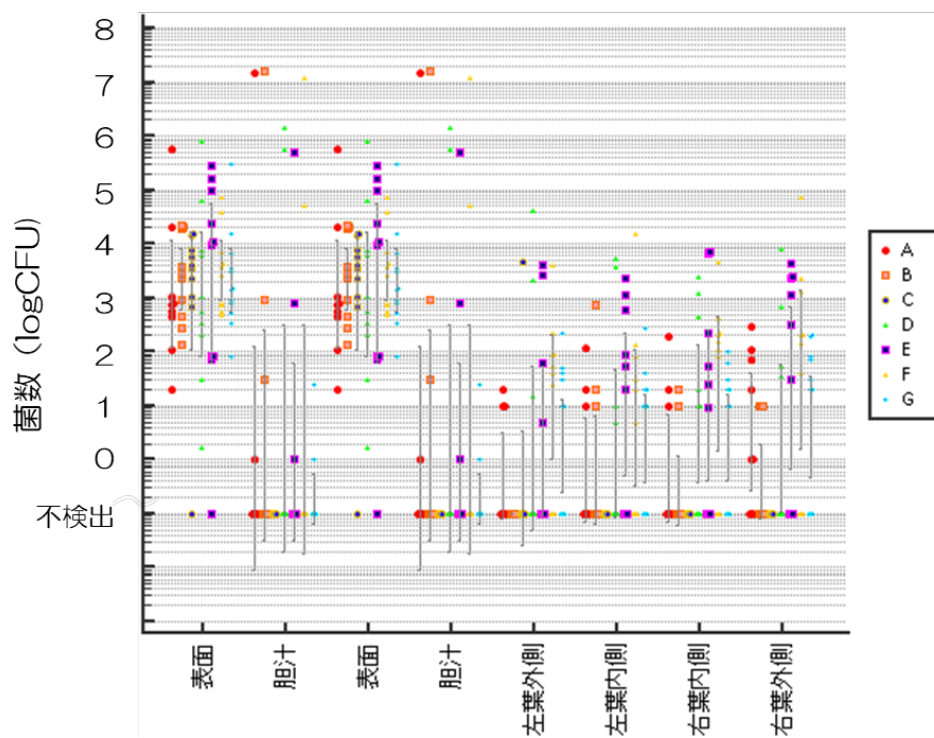


図 9. 自治体 G 由来肝実質検体における季節別指標菌検出状況

A



B

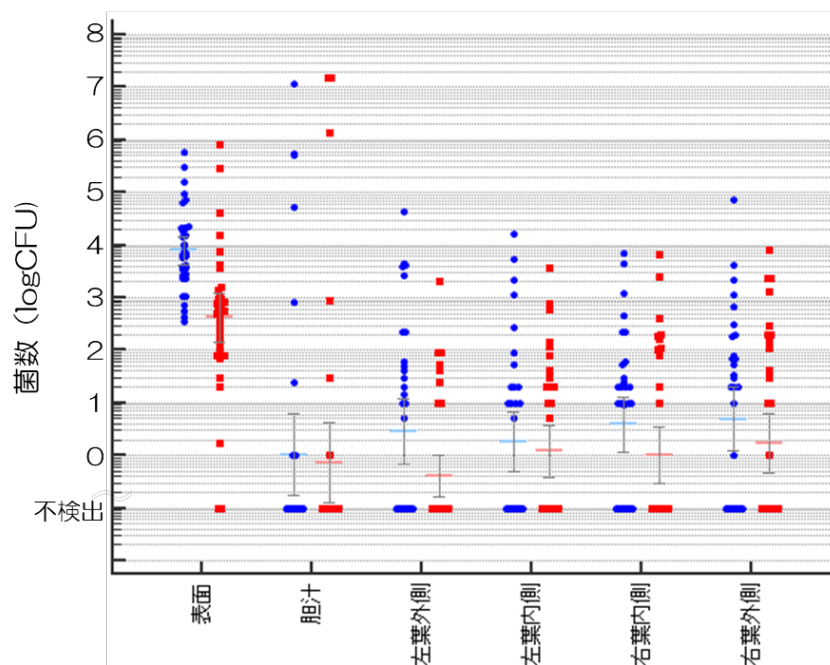


図 10. 健康牛由来肝表面、胆汁、実質における腸内細菌科菌群の分布  
セクション A は施設別の、セクション B は季節別のデータをそれぞれ示す。

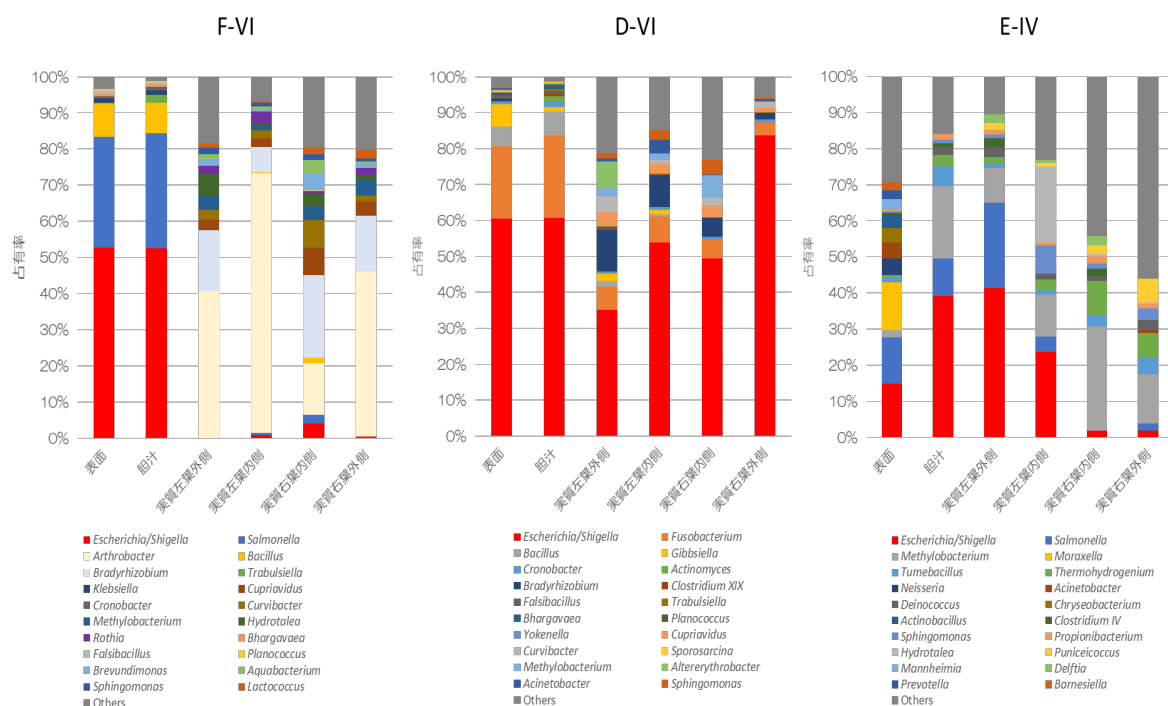


図 11. 肝実質及び胆汁において腸内細菌科菌群を認めた代表個体における部位別構成菌叢

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	単位	生菌数	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌
表面ふき取り	CFU/100cm <sup>2</sup>	7.33E+04	9.56E+03	3.94E+03	4.38E+03
胆汁	CFU/mL	1.00E+06	3.56E+05	2.21E+05	1.64E+05
実質 左葉外側	CFU/g	1.20E+03	1.27E+02	4.53E+02	1.12E+02
実質 左葉内側		4.65E+02	3.85E+02	1.45E+02	1.62E+02
実質 右葉外側		7.14E+02	7.16E+02	5.35E+02	1.68E+02
実質 右葉内側		2.02E+03	1.16E+03	1.10E+02	1.35E+03
実質左葉全体	CFU/g	8.32E+02	5.09E+02	5.42E+02	1.37E+02
実質右葉全体		1.37E+03	6.85E+02	8.35E+01	7.61E+02

表 2-1. 牛肝実質及び胆汁における腸内細菌科菌群の分布状況～胆汁からの検出状況に基づく、肝実質内での分布状況

胆汁からの 検出状況	検体数	実質からの検出状況（％）			
		左葉のみ陽性	右葉のみ陽性	両葉陽性	両葉陰性
陽性	8	1(12.5)	0	5(62.5)	2(25.0)
陰性	62	2( 3.2)	5( 8.1)	3( 4.8)	52(83.9)

表 2-2. 牛肝実質及び胆汁における腸内細菌科菌群の分布状況～肝実質で陽性を示す検体における腸内細菌科菌群の菌数分布

胆汁からの 検出状況	検体数	実質からの最大検出菌数 (CFU/g)		
		左葉のみ陽性	右葉のみ陽性	両葉陽性
陽性	6	$6.2 \times 10^2$	－	$7.1 \times 10^4$
陰性	10	$1.0 \times 10^1$	$8.0 \times 10^1$	$6.4 \times 10^3$

表 3. 牛肝実質で  $10^3$ CFU/g 以上の腸内細菌科菌群を認めた牛個体由来胆汁における、同指標菌の検出状況

検体 (施設-個体)	胆汁からの 検出菌数 (CFU/mL)	実質内最大菌数 (CFU/g)		
		左葉	右葉	分布
D-III	$5.7 \times 10^5$	$4.7 \times 10^3$	$3.7 \times 10^4$	左葉+右葉
E-IV	$3.5 \times 10^5$	$2.3 \times 10^3$	$3.0 \times 10^1$	左葉+右葉
F-II	$1.2 \times 10^7$	$1.6 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$	左葉+右葉
D-VI	$3.6 \times 10^5$	$4.0 \times 10^3$	$6.9 \times 10^3$	左葉+右葉
F-V	－	$5.9 \times 10^2$	$6.4 \times 10^3$	左葉+右葉

平成30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

##### 牛肝臓摘出後の適切な保管・衛生対策に関する研究

研究分担者 佐々木貴正  
研究協力者 中山達哉

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

**研究要旨：**これまでの研究成果から、と畜場における腹腔からの肝臓摘出後、直ちに冷凍（-30℃）しない場合には、肝臓内部温度が体温（約 39℃）から 20℃まで低下するまで約 4 時間を要するため、肝臓内部に細菌が存在した場合には増殖する可能性があることが判明した。一方、肝臓内部の腸内細菌科菌群の高濃度汚染（10<sup>4</sup>CFU/g 以上）と胆汁の腸内細菌科菌群汚染には高い相関が見られ、肝臓内部の高濃度汚染は胆汁検査によって推定できると考えられた。そこで、今年度は、肝臓の適切な冷凍条件、胆汁中のサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の増殖性の検討、並びに胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群の定量解析を行い、肝臓摘出後の適切な保管・衛生対策について検討した。その結果、牛肝臓を冷凍保管（-30℃）した場合には、丸ごと、8（厚さ）X10X20cm、8（厚さ）X10X10cm 又は 5（厚さ）X10X10cm の内部温度が 20℃以下になるまでそれぞれ 2 時間 30 分、2 時間、1 時間 30 分又は 1 時間以内で達成できることが判明した。また、と畜場において 81 頭の肝臓左葉最厚部を計測したところ、中央値は 6.5 cm で 8 cm を超えた検体は 1 検体のみであった。さらに、胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群汚染については、前年度の検体を含めた全 139 検体のうち 13 (9.4%) 検体から当該菌が検出され、陽性検体の菌濃度はすべて 10<sup>6</sup>CFU/mL 以上であった。なお、これら陽性検体からは、サルモネラも志賀毒素産生性大腸菌 0157 は分離されなかった。最後に、胆汁にサルモネラ株 4 株又は志賀毒素産生性大腸菌 0157 株 2 株を接種し培養（38℃）すると 5 時間後には 1000 倍以上になることが明らかとなった。以上のことから、肝臓摘出後は肝臓内部の細菌増殖を抑制するために小分け後、直ちに冷凍することが望ましいこと、胆嚢内胆汁の腸内細菌科菌群汚染は低率である一方で、陽性検体における汚染菌濃度は高く容易に検査によって汚染の有無を判断できること、胆汁中にサルモネラ又は志賀毒素産生性大腸菌 0157 が存在した場合には速やかに増殖することが明らかとなった。

#### A. 研究目的

2012 年 7 月 1 日以降、牛肝臓は生食用としての提供・販売が禁止されたが、生食に対する要望は依然として存在する。例えば、食中毒発生状況データでは、提供・販売が禁止された 2012 年では、牛レバ刺しを原因とするカンピロバクター食中毒の報告が相次ぎ、7 月には駆け込み需要と思われる食

中毒事件が 6 件（いずれもカンピロバクター一食中毒）報告され、さらに、その後一旦牛肝臓料理を原因とする食中毒事件は報告されなくなったものの、2015 年以降は、炙りレバーや低温オイル煮といった加熱程度の低い牛肝臓料理が原因と推定される食中毒事件（カンピロバクター一食中毒及び腸管出血性大腸菌食中毒）が散発的に報告され

ている（表 1）。

生食用牛肝臓の販売・提供の再開に対する要望に応ずべく、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。

通常、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、内臓取扱業者に渡し、胆嚢を切除後、一定時間（半日～翌日）冷蔵室で保管され、と畜場から出荷される。この冷蔵室での保管については、摘出直後の肝臓内部温度は 38～40℃もあり、蛋白変性等の肝臓の化学的変化及び細菌増殖を抑制するために重要な工程であると考えられている。一方で、牛肝臓は、重量 6～8kg、厚み 5～10 cm（最厚部は右葉）もあるため、丸ごと冷蔵室に入れても、肝臓内部温度が細菌の増殖が抑制される温度（20℃）に低下するまで長時間を要すると考えられているが、その具体的な科学的データは存在せず、具体的な改善策は行われていない。肝臓内部の細菌汚染については、いくつかの報告がなされており、肝臓内部の腸内細菌科菌群の高濃度汚染と胆汁の腸内細菌科菌群汚染には高い相関性が見られ、胆汁の腸内細菌科菌群検査によって、高濃度汚染された肝臓を除去することが可能であると考えられるが、これについては胆汁の腸内細菌科菌群の詳細な汚染状況は調査されていない。さらに、肝臓内部汚染の実態は、肝臓内部に存在する胆管内に細菌が存在することに起因すると考えられることから、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌の胆汁における増殖性について確認しておく必要がある。そこで、今年度は肝

臓の適切な冷凍条件、胆汁中のサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の増殖性の検討、並びに胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群の定量解析を行った。

## B. 研究方法

本研究は、1 と畜場の協力の下、2 年間に渡り試験を実施した。当該と畜場は、肥育牛及び交雑種のと殺・解体を実施している。なお、当該と畜場における牛肝臓の取り扱いについては、①肝臓摘出後、②と畜検査員によると畜検査後に、③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、④洗浄されたステンレス製作業台に置かれ、⑤胆嚢切除後に、⑥水切り台に肝臓を置き、⑦次亜塩素酸水で表面を洗浄後、⑧ビニール袋に入れられ、⑨氷水中に約 10 分間浸漬される。その後、⑩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⑪冷蔵室（設定値 4℃）で翌日まで保管される。その後、⑫翌日午前加工販売者に出荷という経緯をたどる。

### 1. 胆汁及び肝臓の採取

胆汁採取は、⑤のステンレス製作業台のある作業室で待機し、肝臓から胆嚢を切除した直後に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、当研究所に持ち帰り、3 時間以内に試験に供した。肝臓は、⑫の出荷時に内臓取扱業者の立ち合いの下で、採取し、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. 肝臓左葉最厚部の測定

81 頭の肝臓左葉部の最厚部の測定は、⑦の次亜塩素酸水洗浄直後に実施した。計測は、左葉最厚部の高さを、定規を用いて 0.5 cm 刻みで行った。

## 3. 肝臓内部の温度変化

出荷時の肝臓を当研究所に持ち帰り、丸ごと又は部分的に切断し、ウォーターバスで約 39°C まで温めたのち、深さ 4 cm の部分に温度ロガー（おんどとり）を取り付けて、冷凍庫（-30°C）に入れて温度変化を計測した。各条件下の試験を 3 回繰り返し、各条件下の平均温度で比較した。

## 4. 胆汁中におけるサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の増殖性

腸内細菌科菌群陰性の胆嚢内胆汁 5 検体を 1 プール検体として使用した。

胆汁にミューラー・ヒントン液体培地で 1 夜培養（37°C）した菌株（ヒト由来志賀毒素産生性大腸菌（STEC）0157 株 2 株、ヒト由来 *Salmonella* Typhimurium 株 2 株及びヒト由来 *S. Enteritidis* 株 2 株）を終濃度が約 2~3 log CFU/mL となるように胆汁に懸濁し、38°C で 5 時間培養した。なお、菌株未添加胆汁を陰性対照とした。菌数計測は、培養後の検体を PBS で 10 倍段階希釈し、3 M 社製のペトリフィルム（EB プレート）に各濃度 2 枚に 1 mL ずつ添加し、培養後に集落数を計測した。なお、集落が観察された場合には、1 検体につき 4 集落を採取し、菌種の同定を行った。

## 5. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験

腸内細菌科菌群の定量試験については、PBS を用いて胆汁を 10 倍段階希釈し、3 M

社製のペトリフィルム（EB プレート）に各濃度 2 枚に 1 mL ずつ添加し、培養後に集落数を計測した。また、前年度の検体を含め、腸内細菌科菌群陽性検体については、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験を行った。志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験は、胆汁を PBS で 10 倍希釈し、37°C にて約 24 時間培養後、培養液 1 mL を 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに分注した。16,000 × g 以上で 5 分間遠心後、上清を取り除き、沈査に 100 µl 滅菌蒸留水を加えて、95°C 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 0157 特異的遺伝子について PCR 法により検出した。サルモネラの分離試験は、ISO 法に従った。

## C. 結果

### 1. 肝臓左葉最厚部の測定

供試した肝臓 81 検体は、黒毛和種 64 頭及び交雑種（黒毛和種 × ホルスタイン）17 頭に由来し、と殺時の平均月齢は 30 か月（最小 25 か月、最大 37 か月）であった。最厚部の範囲は 5~8.5 cm であるが、8 割は 6~8 cm の間であった。8 cm 以上であったのは 5 頭で、そのうち 1 頭（27 か月の交雑種）の左葉最厚部は 8.5 cm であった（表 2）。

### 2. 肝臓内部の温度変化

摘出直後の肝臓内部温度は約 39°C であり、前年度の研究で牛肝臓の丸ごとを冷蔵保管（約 4°C）した場合には、肝臓内部温度が 20°C 以下（ミューラー・ヒントン液体培地及び胆汁中のサルモネラがほぼ増殖しなくなる温度）になるまでそれぞれ約 4 時間を必要とした。一方、今年度、冷凍保管（-30°C）した場合には、丸ごとでは 2 時間

30 分と約半分に短縮された。さらに、8（厚さ）X10X20cm、8（厚さ）X10X10cm 又は 5（厚さ）X10X20cm と小分けにした場合には、2 時間、1 時間半又は 1 時間以内に 20℃以下にすることができた（図 1）。

### 3. 胆汁中におけるサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌の増殖性

供試した 6 株とも 5 時間後には、3.3~3.8 log CFU 以上増加した（表 3）。一方、菌株未添加胆汁からは培養 5 時間後でも菌の発育は認められなかった。

### 4. 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 の分離試験

前年度の検体を含めた全 139 検体のうち 13 (9.4%) 検体から分離され、陽性検体の菌濃度はすべて 10<sup>6</sup>CFU/mL 以上と陽性検体の腸内細菌科菌群濃度は高かった（表 4）。なお、これら陽性検体からは、増菌培養時に菌増殖が認められたものの、サルモネラでも志賀毒素産生性大腸菌 0157 でもなく、その他の腸内細菌科菌群であると考えられた。

## D. 考察

本分担研究は、腹腔からの肝臓摘出後から出荷までの間における肝臓内部汚染の拡大防止に資する科学的根拠の集積を目的としている。と畜場では、腹腔から摘出された肝臓をと畜検査員が検査し、廃棄又は部分廃棄（病変部を削除）と判断する。その後は、内臓取扱業者によって、一旦冷蔵庫に保管され、半日~1 日後にと畜場から出荷される。しかし、牛肝臓は、重量 6~8kg、厚み 5~10 cm という実質臓器であり、さらに摘出直後の肝臓内部温度は約 40℃であるため、冷蔵庫では急激な温度の低下を期

待することができず、肝臓内部に細菌汚染があった場合には増殖する可能性がある。

今回、肝臓を 3 つの大きさに分けて温度変化を計測したところ、予想どおり、小さなブロックにするほど、温度低下速度は速くなるが、その速度には底面の面積よりも厚さが大きく影響していることが明らかとなった。また、実行上、小さなブロックにするほど、切断面積が広くなるため細菌汚染を受ける可能性が高くなり、また、商品価値も低下する。今回の研究では、厚さを 8 cm にした場合、冷凍庫（-30℃）保管で 20℃（サルモネラがミューラー・ヒントン液体培地及び胆汁で増殖がほぼ認められない（5 時間培養でも 10 倍以下）温度）まで 2 時間以内に達成することができた。

肝臓左葉最厚部を計測したところ、8 cm を超えたのは、1 頭（1.2%）であり、この結果は、肥育牛及び交雑種の肝臓左葉を対象とした場合、右葉との接合面を切断することで、要件に適合できることを示している。

サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 は胆汁中で増殖できること、約 1 割の胆汁から高濃度の腸内細菌科菌群が分離されたことから、生体時の胆嚢内胆汁さらには肝臓内部にもこれら菌が存在することがあると考えられ、肝臓内部汚染の拡大防止には、肝臓から胆嚢を可能な限り早く衛生的に切除する必要がある。

以上のことから、生の品質を保持したまま肝臓内部の細菌を殺菌できる殺菌技術が確立できたとしても、肝臓内部汚染の拡大を防止するためには、胆嚢を可能な限り早く肝臓から切除し、さらに、肝臓丸ごとでなく、小分け後に冷凍する必要がある。



## **E. 結論**

- ・ 139 頭中 9.4% (13 頭) の胆嚢内胆汁において、高濃度 ( $10^6$ CFU/mL 以上) の腸内細菌科菌群が検出された。
- ・ これら陽性検体からサルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 は検出されなかった。
- ・ サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 は胆汁で増殖可能であった。
- ・ 腹腔から摘出後の肝臓は、細菌汚染拡大防止のため、胆嚢を速やかに切除し、小分けした上で、冷凍することが望ましい。

## **F. 研究発表**

### **5. 論文発表**

なし

### **6. 学会発表**

なし

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表 1 2012～2018 年間の牛肝臓料理喫食による食中毒事件（届出）

年	発生日	発生場所	原因食品		施設	摂食者数	患者数	死者数
2012	1月23日	愛知県	牛レバ刺しを含む焼肉料理	カンピロバクター	飲食店	3	3	0
	1月29日	京都府	牛レバー刺しを含む肉料理	カンピロバクター	飲食店	22	9	0
	2月28日	宮城県	レバ刺し（推定）	カンピロバクター	飲食店	10	5	0
	4月12日	東京都	会食料理 （焼肉・牛レバー刺し等）	カンピロバクター	飲食店	15	11	0
	6月30日	東京都	牛レバ刺しを含む食事	カンピロバクター	飲食店	5	5	0
	7月1日	秋田県	牛レバー刺し （6/28 飲食店の食事）	カンピロバクター	飲食店	10	8	0
	7月1日	東京都	6月28日の食事 （牛レバ刺しを含む）	カンピロバクター	飲食店	6	3	0
	7月1日	東京都	牛レバ刺しを含む会食料理	カンピロバクター	飲食店	4	4	0
	7月1日	東京都	牛レバー刺し	カンピロバクター	飲食店	2	2	0
	7月1日	島根県	原因施設で提供された食事 （レバ刺し・焼肉を含む料理）	カンピロバクター	飲食店	不明	8	0
	7月2日	東京都	食事（牛レバー刺しを含む）	カンピロバクター	飲食店	4	3	0
	8月1日	広島県	7月30日に提供した生レバー （推定）	カンピロバクター	飲食店	2	1	0
2013	届出なし							
2014	届出なし							
2015	6月6日	茨城県	不明（6月4日に提供された 牛炙りレバ刺しを含む食事）	カンピロバクター	飲食店	6	5	0
	12月23日	大阪府	牛レバー	腸管出血性大腸菌（VT産生）	家庭	3	2	0
	9月22日	奈良県	炙りレバー	腸管出血性大腸菌（VT産生）	飲食店	13	4	0
2016	10月31日	富山県	牛レバーの低温オイル煮	カンピロバクター	飲食店	16	5	0
2017	届出なし							
2018	2月21日	神奈川県	炙りレバー	カンピロバクター	飲食店	3	3	0

表 2 牛肝臓 81 検体の左葉最厚部の分布

肝臓左葉最厚部 (cm)				
$5 \leq x < 6$	$6 \leq x < 7$	$7 \leq x < 8$	$x \geq 8$	Total
13	34	29	5	81

平均月齢: 30か月（最小: 25か月、最大 37か月）

品種: 黒毛和種 64頭、交雑種 17頭

図1 肝臓内部の温度変化（-30℃冷凍庫）

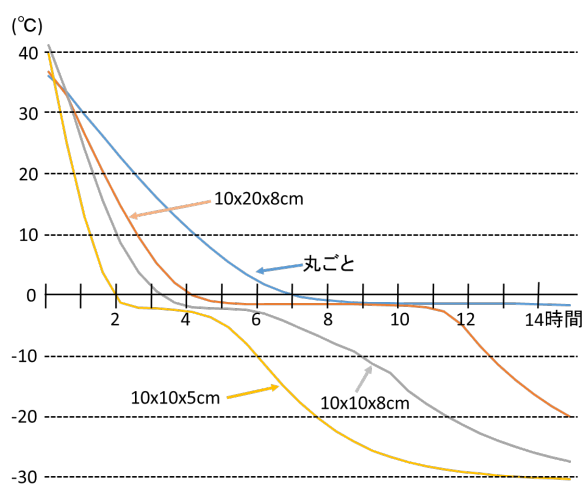


表3 胆汁中におけるサルモネラ及び STEC の増殖性(log CFU/ml)

菌種	株	培養時間(38℃)	
		0 時間	5 時間
STEC	O157-1	2.6	6.4
STEC	O157-2	2.4	6.0
<i>S. Typhimurium</i>	T4-3	3.1	6.4
<i>S. Typhimurium</i>	T4-34	3.0	6.2
<i>S. Enteritidis</i>	E9-2	3.3	6.6
<i>S. Enteritidis</i>	E9-3	2.8	6.1

表4 胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌 O157 の分離結果

採取年月日	月齢	品種	性別	腸内細菌科菌群 (CFU/mL)	<i>Salmonella</i>	O157
2017/11/8	29	黒毛和種	去勢	$2.5 \times 10^6$	-	-
2017/11/8	30	黒毛和種	去勢	$7.9 \times 10^6$	-	-
2017/11/15	34	交雑種	去勢	$1.4 \times 10^7$	-	-
2017/11/15	28	黒毛和種	去勢	$2.6 \times 10^7$	-	-
2017/11/20	32	黒毛和種	雌	$3.6 \times 10^6$	-	-
2018/7/9	30	黒毛和種	去勢	$1.3 \times 10^7$	-	-
2018/7/26	30	黒毛和種	雌	$2.4 \times 10^6$	-	-
2018/7/26	27	黒毛和種	雌	$1.5 \times 10^7$	-	-
2018/11/2	35	黒毛和種	雌	$5.5 \times 10^6$	-	-
2018/11/2	36	黒毛和種	雌	$3.1 \times 10^7$	-	-
2018/11/19	33	黒毛和種	去勢	$5.7 \times 10^6$	-	-
2018/12/6	30	黒毛和種	去勢	$4.5 \times 10^6$	-	-
2018/12/25	31	黒毛和種	雌	$6.6 \times 10^7$	-	-

平成 30 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」

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：**肝臓左葉に対し、サルモネラの 5 桁低減に必要な線量を効率的に照射する方法を検討し、その際の線量分布と殺菌効果について調査した。

縦 20 cm × 横 25 cm、最大厚さ 50 mm の肝臓左葉を、厚さ方向を板状線源の正面に向けて両面照射した際の吸収線量の最大/最小比は 1.104 であり、同等の配置において照射時間を適切に設定すれば、肝臓左葉を 8.2 kGy～10 kGy の範囲内で照射できる可能性が示された。

商業規模のガンマ線照射施設において、トートボックス内の指定位置に、厚さ 50 mm 及び 100 mm の板状の模擬試料を固定し、コンベアシステムで照射室に搬送して照射を行った際の試料中の線量分布測を測定し、厚み方向のガンマ線の透過力とボックス内における適切な試料位置を確認した。この検討結果に基づき、2 つのトートボックスの指定位置に、凍結状態の肝臓をそれぞれ 1 つずつ配置して照射を行ったところ、試料 1（最大厚さ 64.4 mm）では、線量範囲が 8.94 kGy ～ 9.49 kGy、最大/最小比 1.062、試料 2（最大厚さ 76.2 mm）では、8.59 kGy ～ 9.33 kGy、最大/最小比は 1.089 となり、線量測定の不確かさを考慮しても、8.2 kGy～10 kGy の線量範囲で照射を達成できる可能性が示された。ただし、重量や寸法にある程度の幅のある 11 検体の左葉試料（932g～2,350g、寸法 約 27～32 cm × 17～28 cm、最大厚さ 38 mm～57 mm 程度）を、同様の照射条件で一斉に処理した場合には、試料表面の線量範囲でも 8.69 kGy ～ 9.90 kGy、最大/最小比 1.139 に広がった。多数の肝臓試料を複数のトートボックスに装填して、すべての検体のいずれの部位も目標範囲の線量に収れんさせるには、個々の試料の形体や比重をできるだけ揃えて再現良くトートボックス内の定位置に装填する工夫が必要と判断された。なお、これら 11 検体の照射前の最大菌数は、一般生菌数  $10^5$  CFU/g、腸内細菌科菌群  $6.2 \times 10^3$  CFU/g であったが、ガンマ線照射により、増菌しても、11 検体のすべてが不検出となるレベルまで低減された。

## 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。<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確立することを目的とする。H29年度までに、25gの牛肝臓中への接種実験により、脱気包装、ドライアイス下において  $10^5$  CFU/g の *E. coli* O157 および *S. Enteritidis* を低減（不活化）するために、それぞれ 5.3~5.5 kGy、8.2~8.5 kGy（信頼度 95%~99%）の線量が必要であることを明らかにした。

本研究では、放射線照射の実用性を評価する目的で、商業用照射施設において、牛肝臓左葉部位に対して、*S. Enteritidis* を

$10^5$  CFU/g 不活性化するガンマ線を照射するための条件について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

牛肝臓の採材部位は、他の分担研究の結果から、最も微生物汚染が少ないと考えられる、左葉部分を対象とした。微生物試験用の牛肝臓試料は、食肉処理場にて屠殺直後に取り出して急冷し、牛肝臓塊より左葉（約 0.9 kg~2.74 kg）を切り出して用いた。また、商業用施設での線量分布を予備的に調査するための模擬試料として、市販の板こんにゃく（ $14 \times 7.5 \times 2.5$  cm 密度約 0.988 g/cm<sup>3</sup>）を用いた。

### 2. ガンマ線照射施設

ガンマ線照射は、①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（7 セル）にて静置の両面照射を、②コーガイソトープ株式会社 1 または 3 号機にて、トートボックスを用いた連続照射を行った。

①は照射室に配置された照射台上に試料を設置して照射するもので、前年までの試験により、線源保護板から 20 cm 以上の距離に試料容器（400 mm（横）× 240 mm（縦））を設置した際には、試料容器表面における線量分布がほぼ均一であることが確認されている。なお、試料の厚さ方向の線量の均一性を保つために、照射時間の半分で試料を反転させ両面から照射を実施した

②の商業用施設は、ノーディオン社製ガンマ線照射装置 2 基、JS-7500（60-Co 約 66.6 PBq）および JS-7500（60-Co 約 3.3 PBq）

を備えている。これらの装置には、専用照射容器として、ステンレス製のトートボックス（長さ 58cm x 幅 46 cm 高さ 89 cm）による連続搬送設備が付属しており、照射試料はトートボックス中に充填され、コンベア上を連続移動して照射室へ入る。照射室内のトートボックスは、室内中心にある板状線源を取り囲むように配置されたコンベア上を、ポジションを変えながら移動してゆく。各トートボックスは、設定されたサイクルタイムにより滞在時間を規定され、最終的に板状線源の両側を通過することで、容器内の試料が連続的に両側面から一定線量で照射される。図 1 に照射施設の概観と、線源に対すトートボックスのポジションの相対位置およびトートボックス内の線量分布イメージを示す。

### 3. 肝臓左葉および小片の静置照射における線量分布確認

牛肝臓左葉（1,800g、20 cm × 25 cm、厚さ 50 mm）を 2 枚に切断して中心内面 5 か所にアルミ蒸着シートで包装したアラニンペレット線量計を挟み、その後 2 枚を重ねて元の形状に戻してガスバリア袋で脱気包装した。包装後の外面にも線量計を張り付けた（図 2）。

薄切りした肝臓小片を作成し、その 5 枚を 10 cm × 7 cm の発泡スチロール皿に並べ、切り身の間および、皿表面に線量を装着し、ガスバリア袋で脱気包装した。包装した袋の上面にも線量計を取り付けた。この状態の試料 2 皿分（肝臓重量：84.6g 及び 87 g）を作成した。なお、包装試料の肝臓部分の厚さは約 1 cm であった（図 3）。

包装し線量計を取り付けた左葉は、ほぼ

同面積の紙箱に入れ、トレー入りの切り身肝臓は、2 つのトレーを重ね、それぞれ厚さ方向の中心をそろえて、発泡スチロール箱（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））に入れ、高崎量子応用研究所の照射室にて、線源保護板からレバーの厚さ中心までの距離が 30 cm、高さ中心が 22.5 cm となるように立てかけて、前面から室温にて照射した。線量率は約 1.5 kGy で、照射時間の半分（4 時間）で試料を反転した（図 4）。

吸収線量の確認は、照射試料の外箱の基準位置（試料中心位置と同じ距離の箱側面）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、上述のように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）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. 連続照射における線量分布予備試験

肝臓の模擬試料として板状のこんにやくを縦・横 3 枚ずつ 1 面 9 枚となるように並べ、これを 2 段（2 枚重ね（厚さ 5 cm）または、4 枚重ね（厚さ 10 cm）となるように固定した。各こんにやくの中心表面と重ね合わせたこんにやく板の間、および側面にあたる箇所にアルミ蒸着シートに封入したアラニン線量計を張り付けた。（図 5）

作成した立方体上の模擬試料（22 cm × 42 cm 厚さ：50 mm または 10 mm）を、発泡スチロール箱に立てて箱の中央に設置し、すきまに発泡スチロールを埋めて固定した。この発泡スチロール箱を、照射装置に付属したトートボックスに 2 段重ね（こんなにやく 2 枚重ね 厚さ 50 mm の模擬試料）または、中心部に 1 段（こんなにやく 4 枚重ね 厚さ 100 mm）をセットし、コーガアイソトープ社 1 号機（1 サイクル、約 1 時間）で、目標線量 10kGy または、3 号機で、予備照射として、サイクルタイム 2 分で 1 周照射して線量測定を行い、サイクルタイム 2 分 5 秒で 8 周照射し、目標最小線量 8.2 kGy を超えるような照射を行った。トートボックスへの模擬試料の装填手順とボックス内での位置イメージを図 6 に示した。

線量測定は、ESR 測定装置（ブルカー社製 e-scan）を用いて、アラニンラジカルに由来するシグナル強度を測定し、NPL アラニンを用いて同社で比較校正して作成した検量線を用いて線量を読みだした。照射時の試料温度は、31.1℃（2 枚重ね試料）または、19.3℃～22.4℃（平均 20.4℃）であった。

#### 5. 肝臓左葉の連続照射における線量分布

2 頭分の交雑牛の肝臓（総重量 7.72kg および 6.44 kg）から左葉（重量 2.74 および 2.04 kg）を切り出し、前項 3 で示したように、アルミ蒸着シートに封入したアラニン線量計を切り開いた中心部及び包装後の表面にそれぞれ 5 か所、左葉 1 つにつき 15 か所ずつ取り付けた。この左葉試料を-80℃の超低温層にて凍結したのち、ドライアイスで梱包して照射施設に送付した。

アラニン線量計が取り付けられた凍結肝臓試料は、発泡スチロール板に PP バンド（黄色）で固定し、発泡スチロール容器に立てて設置し、倒れないようにすきまに発泡スチロールを埋めた。そして、主なガンマ線照射面を遮らないようにドライアイス板を配置した（図 7）。なお、試料表面には熱電対式温度プローブ（安立計器株式会社製 ハンディタイプ温度計 HA-400E）の先端を差し込み、照射前後の温度測定を行った肝臓試料とドライアイスを含めた発泡スチロール容器は、前項 4、の 1 段照射の位置と同じになるように、トートボックス中に配置し、コンベアにより、サイクルタイム 2 分 5 秒で 8 周照射した。

試料に取り付けたアラニン線量計の線量は、ドライアイス下で、校正照射を行ったアラニン線量計で作成した検量線を用いて線量を算出した。

#### 6. 肝臓左葉連続照射における殺菌効果

2 か所の食肉処理場 A または B において、それぞれ 6 頭および 5 頭分の肝臓左葉を得た。採材後の肝臓は、冷蔵状態で研究所に輸送し、入手直後（と畜後 2 日目）、方形葉側の一部（25 g 程度）を微生物試験用にサンプリングし、残りを、ガスバリア袋（PTS 袋；三菱ガス化学製、PB180250P 350×500mm）を用いて脱気包装し、直ちに-80℃の超低温槽で保管した。凍結状態の左葉は、商用照射施設に送付後、前項と同様に、トートボックスに装填して搬送し、ドライアイス下で照射を行った。なお、11 頭の肝臓検体は、48 個のトートボックスに散在するように配置した。照射装置は前項 5. と同様の運転条件とした。線量測定は、各々

の肝臓左葉の厚さが最大及び最小となる部分の表面にアラニン線量計をとりつけて行った。

照射前の肝臓検体は、25 g を 225 mL の菌緩衝ペプトン水を加えて、ストマッカーで乳剤化したのち、標準寒天平板および VRBG 平板 (Oxoid) にて、一般生菌数及び、腸内細菌科菌群を計数した。

ガンマ線照射後の肝臓検体は、25g をサンプリングし、225 mL の滅菌緩衝ペプトン水を加えて 10 倍乳剤とした後、35 °C で一昼夜培養した。培養した菌液は標準寒天平板および VRBG 平板 (Oxoid) に一白金耳を画線し、35 °C で一昼夜培養し、腸内細菌科菌群の生残の有無を確認した。

## C. 研究結果および考察

### 1. 静置照射における肝臓(左葉)および切り身試料中の線量分布

表 1 に牛肝臓左葉(1,800 g 最大厚さ 50 mm)及び、包装した切り身(85~89g 程度、厚さ: 10 mm)を静置して両面から照射した際の線量分布を示す。薄く切ってほぼ均一な厚さに包装した切り身に張り付けた線量計の吸収線量は、平均で 12.67 kGy 及び 12.53 kGy、左葉のそれは、平均で、12.24 kGy と、厚さの大きな左葉に比べて、切り身の吸収線量はやや大きくなった。また、試料内の線量の変動も小型に成型した切り身のほうがやや小さく、線量の最大/最小比 (DUR: Dose Uniformity Ratio) は、1.05 ~1.06 程度であった。一方、試料内の厚さも不均一で最大厚さの大きな左葉の DUR は、1.104 となった。ただし、左葉の DUR から、腸内細菌科菌群であるサルモネラの 5 桁低減に必要な最小線量の 8.2 kGy となるよう

に照射時間を設定した際の最大線量は 9.02 kGy と算定されることから、十分に狭い線量分布範囲での照射が可能であると判断された。凍結状態(ドライアイス下)で、肝臓を照射するためには、前面から来るガンマ線の照射方向を遮らないように、例えば、肝臓の背面からドライアイスを当て、肝臓を途中で反転しながら同位置にて両面照射を行えば、同型の肝臓左葉を同様に良好な線量分布で照射を行うことが可能と考えられた。

### 2. 連続照射(商業施設)における模擬試料の線量分布

通常、商業ベースで受託照射を行っているガンマ線照射施設では、規定の大きさのトートボックスと呼ばれる専用容器中に照射試料を詰め、コンベアやハンガーリフト方式で、トートボックスを、定められた搬送経路で移動させ、コバルト 60 線源の周りを設定した速度で通過することで照射を行っている。トートボックスはある程度の大きさを持っており、ボックス内の照射試料の位置やボックス内の試料との相互作用により、吸収線量に分布が生じる。

本研究において、実証例として使用した商業施設では、長さ(板状線源に平行する横幅) 58cm x 幅(線源からの距離方向の奥行) 46 cm、高さ 89 cm のステンレス製のトートボックスが搬送系で利用されている。線源との位置関係から、図 1 右に示した高さ方向及び幅(奥行)方向の線量分布が生じることが予測された。そして、できるだけ均一な線量分布となる照射を行うためには、幅(奥行)方向に対して、可能な限り薄い試料をトートボックスの中心部に



立てるように配置することとが有効であると考えられた。

そこで、このような試料配置におけるガンマ線の厚さ方向の透過力と面方向の均一性を予備的に探るため、板状のこんにやく（密度：0.988 g/cm<sup>3</sup>）を用いてその表面と中心部の各位置での線量分布を求めた。

図8に、2枚重ねのこんにやくを9組（厚さ50mm）として、発泡スチロール箱に入れトートボックス内に2段重ねにした配置（図6中段）において、約10kGyを目標として照射した際の、各位置の線量計の吸収線量を示した。また、表2にこれらの結果をまとめた。

上下2段に入れた発泡スチロール箱中の模擬試料（厚さ50mm）の吸収線量は、下段の箱中で9.34～10.66kGy 上段の箱中では9.69～10.64kGy、全体では9.34～10.66kGy（中央値10.0kGy 平均値10.01kGy）、DUR（最大/最小比）は全体でも1.14と良好な分布を示した。この照射条件では、サイクルタイムを1週の照射で10kGy（照射時間は約1時間）となるようにセットしていることから、サイクルタイムを適切に設定すればサルモネラの5桁低減に必要な最小線量8.2kGyを超え、10kGyを下回る範囲での照射を実現できると考えられた。

さらに、図9に4枚重ね（厚さ100mm）のこんにやくをいれた発泡スチロール箱をトートボックスの中央に1箱入れて照射した際の線量分布を示す。照射は、コーガアイソトープ3号機を用い、最小線量が8.2kGyを上回るようにサイクルタイムを調節し、8周照射とした。100mmの厚さの試料では、線量は、前述の50mm厚さの試料に比べてより広範囲に広がり、最小線量は面方向の中

心位置（試料位置5）の試料の厚さ中心（位置③）で、8.23kGy、最大線量は試料角位置の表面にあたる場所で10.13kGyとなり、DURは1.22であった。

### 3. 商用照射施設における連続照射での牛肝臓（左葉）の線量分布

模擬試料の線量分布測定結果から、試料の厚さが80mm程度までであれば、同様の配置において、目標範囲内の線量での照射が可能と予測した。そこで、厚さが64.4mm及び、76.2mmの凍結した牛肝臓左葉を、前項の100mm厚さの模擬試料の照射時と同様に、発泡スチロール箱の中心に立てて配置し、照射試験を行うこととした。照射中の温度を保つため、主に試料上部にドライアイス置いて冷却した。この試料箱をトートボックスに1つずつ装填し、線源を8周、周回して合計17時間かけて照射を行った。照射前および各周回の途中で、試料温度を測定した結果、照射前が-67.9℃、照射終了後が-66.7℃で周回中の最低温度は-70.1℃であった。

図10に2頭分の凍結肝臓（左葉）内の線量分布の測定結果を示す。最大厚さが64.4mmの試料1では、最小線量8.94kGy、最大線量9.49kGyであり、最大/最小比（DUR）は1.062となった。また、肝臓に張り付けた15個の線量計の吸収線量の平均は、9.17kGyであった。一方、最大厚さ76.2mmの試料2では、吸収線量の平均は、試料1よりやや低い8.92kGyとなり、最小線量8.59kGy、最大線量9.33kGy、DURは1.089であった。いずれの試料も、同一のサイクルで照射を行ったこんにやく（模擬試料厚さ100mm）よりも、小さなDURとなった。な

お、最小線量を示した箇所は、両試料とも、凍結した試料の厚さが最大となる左葉の中央部であり、最大線量を示した箇所は、厚さが小さくなる左葉の先端部分である端側の表面部分(線量計番号⑨)であった。

牛肝臓照射の微生物制御に必要な線量は、最小 8.2 kGy であるが、仮に最大線量を定めるとすれば、コーデックス規格で一般的に認められている 10 kGy が想定される。上述の肝臓(左葉)試料における線量分布の測定結果は、線量測定の不確かさを 5%程度見込んで、この線量範囲で照射を達成できる可能性があることを示している。

#### 4. 連続照射における肝臓左葉の殺菌効果

2 か所(A、B)の食肉処理場から肝臓左葉試料を調達し、合計 11 検体を脱気包装後に凍結し、前項と同様の条件で照射した。照射時の試料温度は、- 52.3 ~ - 72.2℃、平均で - 67.2℃であった。

表 3 に試験に用いた各肝臓の重量と厚さ、線量測定結果、照射前後の微生物検査結果をまとめた。

試験に供した肝臓は、照射時の重量が、932g~2,350g、寸法 約 27~32 cm × 17~28cm、最大厚さが 38 mm~57 mm程度であった。照射後の吸収線量の測定結果は、試料厚が最大となる表面の部分で 8.69 kGy~9.46kGy、厚さが最小となる表面部分で 8.96 ~9.90 kGy であった。

この試験では、線量が試料内で最小となりうる、肝臓の内部線量を測定していないが、試料の最大厚さが、同一の条件で照射した、こんにやく試料(厚さ 100 mm)や、前項の肝臓試料(厚さ 74.6 mm)よりも小さい範囲にあることから、肝臓の内部であって

もこれらの最小線量である 8.28 kGy を下回る部分は存在しないと考えられた。

今回照射した全 11 試料の最大線量(9.90 kGy)と最小線量(8.69 kGy)の比は 1.139 であり、測定した範囲に限定しても、前項で肝臓内部にも線量計を配置して求めた 2 つの肝臓の最大線量(9.49 kGy)と最小線量(8.59 kGy)の比である 1.104 を上回っている。11 個の肝臓試料それぞれの最大厚さは、38 mm~57 mm程度と、それほど大きくないため、個々の肝臓内の線量分布の範囲はそれほど大きくはないと考えられるが、肝臓の個数が増えたことで、個体間の厚さや形状のばらつきが大きくなり、同じバッチの照射試料全体の線量範囲が広がったと考えられる。また、実測した最大線量の 9.90 kGy は、線量測定の不確かさを考慮すると、線量上限を 10 kGy に設定した場合において十分な余裕は無く、バッチ全体の線量分布をより小さくする工夫が必要と考えられた。

肝臓試料の微生物汚染状況は、処理場 A で入手した肝臓の一般生菌数  $7.4 \times 10^2$  CFU/g ~  $3.6 \times 10^3$  CFU/g、腸内細菌科菌群は、6 検体中 5 検体が検出限界未満、1 検体の菌数が  $4.5 \times 10^2$  CFU/g、処理場 B では、一般生菌数  $8.5 \times 10^4$  CFU/g ~  $3.2 \times 10^5$  CFU/g、腸内細菌科菌群  $8.1 \times 10^2$  CFU/g ~  $6.2 \times 10^3$  CFU/g であった。照射後の微生物検査に際し、検体から 25g をサンプリングし、これを前培養後に平板培養を行った結果、11 検体全てにおいて、一般生菌および腸内細菌科菌群は検出されなかった。

多数の肝臓試料を複数のトートボックスに装填して効率的な照射を実行する場合、すべての試料におけるいずれの部位におい

ても、線量範囲を目標範囲に収めるためには、個々の肝臓試料の形体（厚さ）をできるだけ揃えて再現良くトートボックス内の定位置に装填することが必要となる。そのためには、許容される DUR を達成できるように照射方向の奥行を小さくした立方体容器を設計し、その中にできるだけ比重を一定にして肝臓試料を充填し、各々のトートボックス内の試料配置と密度を揃えるなどの工夫が必要となる。

実際の商業照射施設を用いた効率的な連続照射の運用に際しては、基準とする線量の考え方を明確にした上で、各トートボックス内における肝臓試料の線量を、線量測定の不確かさを考慮しても、目的範囲に収れんさせる照射方法を決定する手順を定めるとともに、手順通りに照射が実施されたことを検証する手法についても、予め定めておくことが必要と考えられる。

#### D. 結論

牛肝臓中のサルモネラの 5 桁低減に必要な線量を、肝臓左葉を効率的に照射する方法を検討し、その際の線量分布と殺菌効果について調査した。

縦 20 cm × 横 25 cm、最大厚さ 50 mm の肝臓左葉を、厚さ方向を板状線源の正面に向けて両面照射した際の吸収線量の最大/最小比は 1.104 であり、同等の配置において照射時間を適切に設定することで、肝臓左葉を 8.2 kGy ~ 10 kGy の範囲内で照射できる可能性が示された。

商業規模のガンマ線照射施設における連続搬送システムにおいて、厚さの異なる模擬試料をトートボックス内に配置した際の線量分布測定を行い、厚み方向のガンマ線

の透過力とボックス内における適切な試料位置を確認した。この結果に基づいて決定した試料配置により、2 つのトートボックスのそれぞれに、凍結状態の肝臓を 1 つずつ充填して照射を行い、肝臓内部も含め線量分布を確認したところ、最大厚さ 64.4 mm および最大厚さ 76.2 mm の 2 つの肝臓の線量範囲は、8.59 kGy ~ 9.49 kGy、最大/最小比 1.104 であり、線量測定の不確かさを考慮しても、8.2 kGy ~ 10 kGy の線量範囲で照射を達成できる可能性があることが示された。ただし、試料内及び試料間の形体（特に厚さ）の変動の大きい 11 検体の左葉部位を、同様の照射条件にて処理した場合には、試料表面で測定した線量の範囲が 8.69 kGy ~ 9.90 kGy、最大/最小比 1.139 に広がった。なお、これらの検体の微生物は一般生菌、および腸内細菌科菌群とも検出限界未満のレベルに低減された。

多数の肝臓試料を複数のトートボックスに装填して連続的に照射を実行する場合、すべての検体のいずれの部位も目標範囲の線量に収れんさせるためには、個々の試料の形体や比重をできるだけ揃えて再現良くトートボックス内の定位置に装填する工夫が必要と判断された。さらに、規格基準を設けて照射行程を管理する際には、照射条件を決定する手順を定めるとともに、日常的に手順通りの照射が実施されたことを検証する手法についても規定しておく必要がある。

#### 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/2r9>

[852000002fsbi.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 他、牛肝臓内部における *Campylobacter jejuni* のγ線照射にする殺菌効果、日本食品科学工学会誌、65 (2018) 259-263.
- 2) Susumu Kawasaki, Mie Saito, Mari Mochida, Fia Noviyanti, Hajime Seito, Setsuko Todoriki, Inactivation of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella* Enteritidis in raw beef liver by gamma irradiation, Food Microbiology 78 (2019) 110- 113.

講演・研修会等

なし

#### H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

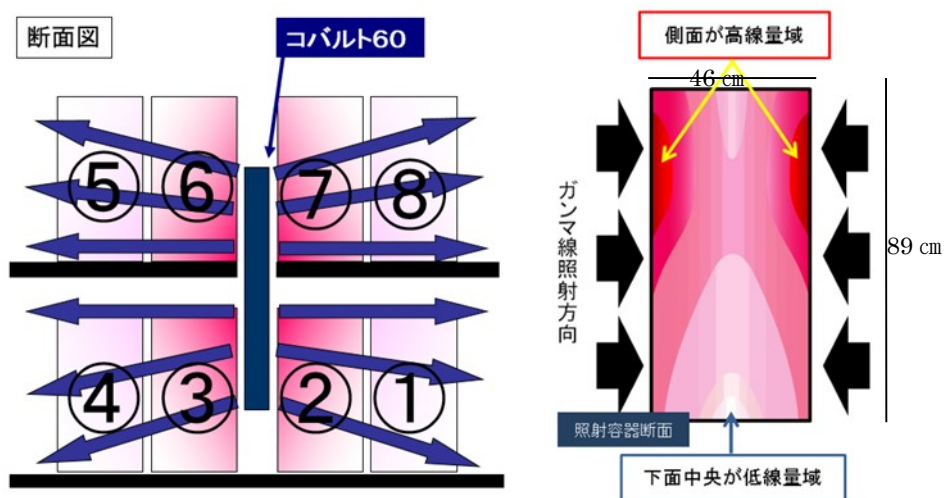
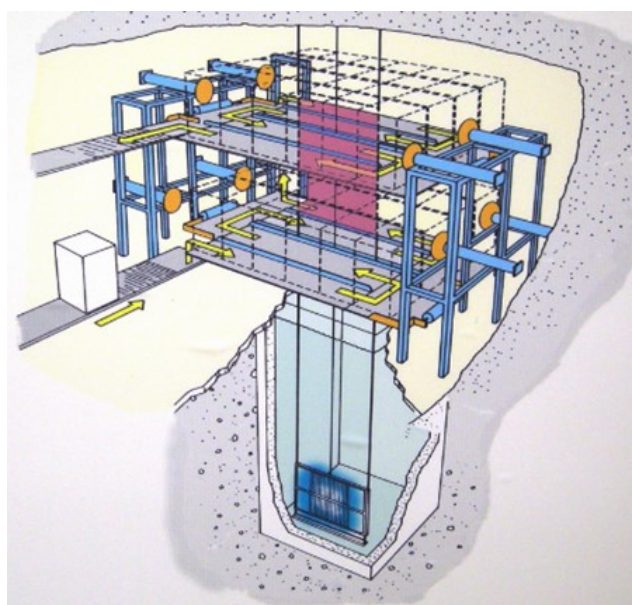


図 1. 商業用照射施設概略(上)と線源の周りを移動するトートボックスの相対位置と箱内の線量分布イメージ(下)

線源は照射時にはプールから引き上げられ、照射室内で容器の中心に固定される。照射容器は上下 2 段左右 4 列あり、各列 6 容器ずつ並んでおり、48 容器が配置される。(図は線源の断面方向での容器列を示している)照射容器は線源のまわりを 1 コマずつ一定時間(サイクルタイム)ごとに間欠で移動する。早く動くとも弱く照射され、ゆっくり動くとも強く照射される。時間によって照射量をコントロールする。48 回移動すると照射室から排出される。この移動の際、照射容器(トートボックス)の両側面から照射されることになるが、線源位置、距離との関係から、容器内の線量は、およそ下図右のような分布が生じる。



図2. 肝臓左葉へのアラニン線量計の取り付け

切り出した牛肝臓左葉を、方形葉側の厚い部分から2枚になるように切り開き、内面に密封したアラニン線量計を配置し(5か所)、2枚をもとの形になるように合わせ、ガスバリア袋で密封した。包装後の肝臓の両面にも線量計を張り付けた。



線量計(5か所)を張り付けた  
発砲スチロールトレイに  
切り身の肝臓を載せる

切り身の間に線量計挟む

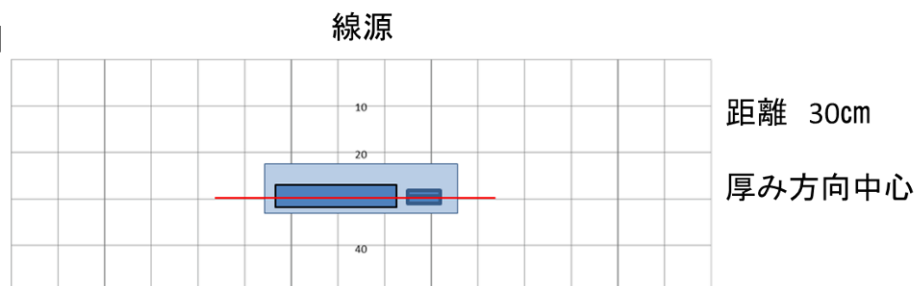
No 6 ~ 10 (5か所)



全体を脱気包装(シール)の後、  
上面に線量計を貼り付け

図3. 肝臓切り身試料の包装とアラニン線量計の取り付け

上から見た図



照射箱内(透視図)

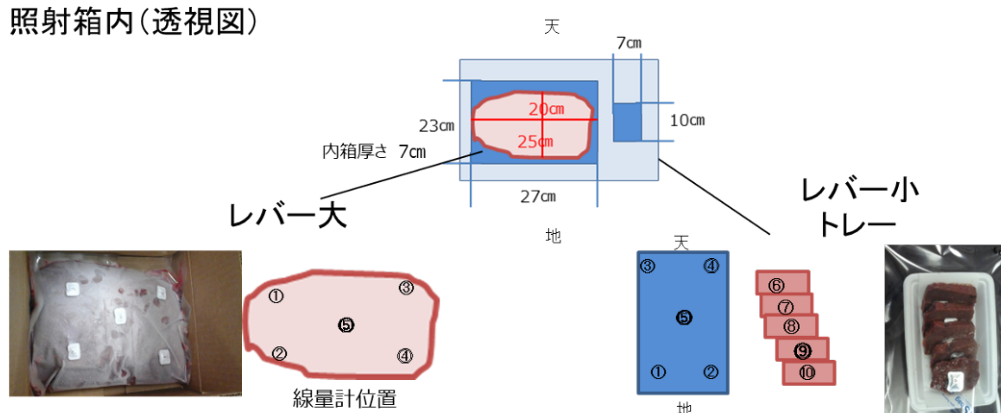


図4. 静置照射における試料箱の設置位置と箱内配置

板状線源の正面に試料を入れた発砲スチロール箱を立て、試料中心の距離を線源保護板より 30 cmとした。半分の照射時間(4 時間)で中心位置の距離を保ったまま試料を反転させた。





縦(7.5 cm) 横(14 cm) 厚さ(25 mm)



2 枚重ね 厚さ(25 mm)



4 枚重ね 厚さ(100 mm)



こんにゃく中心 1 個ずつ線量計を貼り付け、2 または 4 枚重ねとして線量計を挟み裏面中心にも線量計を張り付けた、これを 9 組並べた。(右図)。



図 5. 模擬試料(こんにゃく)への線量計取り付け手順(上)、と 1 面 9 枚のこんにゃくを組み合わせた際のこんにゃく位置の番号と線量計位置

口の番号は資料番号。赤丸はこんにゃく板中心の線量計位置。青丸は 6 面全体での外側線量計位置を示す。4 枚重ねの際は黄色塗りつぶしの位置の測定はしていない。



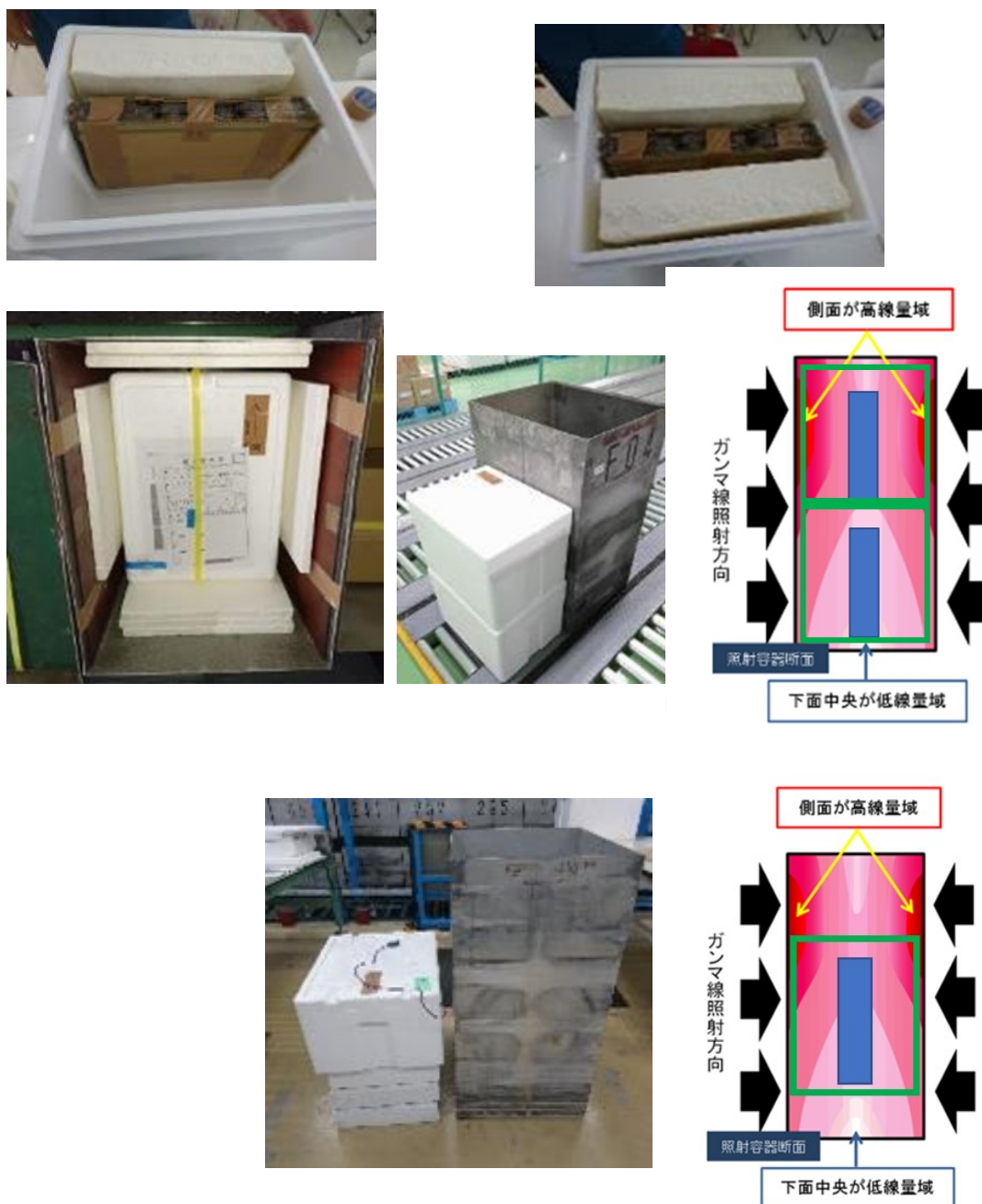


図6. 発泡スチロール箱への模擬試料(こんにゃく)の装填(上)、トートボックス中の発泡スチロール箱および試料位置のイメージ(中、下)

こんにゃく2枚重ねの際は中段のように発泡スチロール箱2箱それぞれに模擬試料を入れ2段に重ねてトートボックスに入れた。模擬試料(青口)はイメージ図に示すようにトートボックス中心の線量の弱い中央部に位置するように配置した。こんにゃく4枚重ねの試料は、トートボックス中に1箱の発泡スチロール箱を装填し、線量の変動が一番少ない場所に配置できるよう、箱の高さを調節した。



図 7. 牛肝臓（左葉）の発泡スチロール箱への装填

凍結肝臓試料は、発泡スチロール板に PP バンド（黄色）で固定し、発泡スチロール容器に立てて設置し、倒れないようにすきまに発泡スチロールを埋めた。主なガンマ線照射面（青矢印方向）を遮らないように板状ドライアイスを側面および上面に配置した（赤丸印）。

表 1 静置照射（両面）における、牛肝臓内の線量分布（左葉（厚さ 50 mm）：左、および切り身包装（厚さ 20 mm）

位置	Dose (kGy)	相対値*	位置	No1		No2	
				kGy	相対値*	kGy	相対値*
中心	1	12.63	上面	1	12.37	12.52	
	2	12.32		2	12.36	12.60	
	3	12.81		3	12.66	12.69	
	4	12.52		4	12.61	12.86	
	5	12.61		5	12.56	12.78	
上面	6	12.07	内側	6	12.68	12.52	
	7	11.60		7	12.86	12.54	
	8	12.52		8	12.49	12.55	
	9	11.89		9	12.79	12.64	
	10	11.99		10	12.73	12.37	
下面	11	12.18	下面	11	12.89	12.56	
	12	11.70		12	12.60	12.14	
	13	12.44		13	12.85	12.40	
	14	12.08		14	12.68	12.27	
	15	12.16		15	12.93	12.44	
平均	12.24		平均	12.67		12.53	
SD	0.355		SD	0.178		0.186	
RSD %	2.90		RSD %	1.40		1.48	
最小	11.60		最小	12.36		12.14	
最大	12.81		最大	12.93		12.86	
最大/最小	1.104		最大/最小	1.048		1.059	

\* 相対値：外箱の中心線上の線量 12.44 kGy を 1 とした時の相対線量 線量計位置は図 4 参照。



□の番号は資料番号。赤丸はこんにゃく板中心の線量計位置。青丸は9面全体での外側線量計位置を示す。

上段				
10.11		10.64		10.22
10.59		10.61		10.41
10.32		10.15		10.38
	10.10	9.98	10.03	
	9.81	9.86	9.75	
	10.11	9.96	10.07	
10.03	9.94	9.716	9.873	10.13
10.37	10.14	9.873	9.932	9.99
10.28	9.69	9.932	9.796	10.17
	9.87	10.28	10.07	
	10.11	9.827	9.88	
	9.95	9.748	9.78	
10.53		10.23		10.41
10.48		10.06		10.05
10.55		10.52		10.46
下段				
10.28		9.97		10.22
10.66		10.38		10.41
10.32		10.36		10.38
	10.00	10.05	10.09	
	9.87	9.82	9.83	
	10.25	10.04	10.17	
10.02	9.60	9.49	9.46	10.17
9.54	9.74	9.61	9.77	9.86
10.26	9.51	9.66	9.75	10.21
	9.39	9.34	9.34	
	9.74	9.74	9.64	
	9.53	9.57	10.54	
9.89		9.69		9.99
9.69		9.62		9.69
10.06		9.96		9.97

図8. 模擬試料（こんにゃく）中の線量分布（2枚重ね 厚さ50mm）

赤字：表面 黒字：中心（2枚の間） 青字：裏側の線量計の吸収線量（単位：kGy）

□の枠の位置は、本図最上の写真に示したこんにゃくの位置1～9に相当する

背景色 背景色の位置は写真中の青丸（側面近く）位置の線量を示す。

（側面に線量計を貼り付けると被照射物の吸収より大きくなってしまいうため、端に近いところで2枚のこんにゃくの間挟んでいる）箱中の試料配置は図6. 中段の写真を参照。

表 2. 商業照射施設における模擬試料(こんにゃく) 中の線量分布 (2 枚重ね 厚さ 50 mm)

	下段 (中心部)	下段 (側面部)	下段 (箱全体)	上段 (中心部)	上段 (側面部)	上段 (箱全体)	全体
平均 (k Gy)	9.76	10.06	9.90	9.92	10.32	10.11	10.01
SD (k Gy)	0.29	0.29	0.28	0.149	0.2	0.22	0.31
RSD (%)	3.01	2.84	2.79	1.496	1.96	2.13	3.13
最小 (k Gy)	9.34	9.54	9.34	9.69	9.99	9.69	9.34
最大 (k Gy)	10.54	10.66	10.66	10.28	10.64	10.64	10.66
DUR (最大/最小)	1.13	1.12	1.14	1.061	1.06	1.10	1.14

箱中の試料配置は図 6. 中段の写真を参照

上段：トートボックス中上側の発泡スチロール箱に入れた模擬試料、下段：下側の発泡スチロール箱中の試料

中心部：こんにゃくの真ん中に張り付けた線量計の線量(図 5、図 8 写真 赤丸印位置、側面部：同写真 青丸印位置



位置	試料1端	試料1	試料2	試料3	試料3端
①	9.90	9.58	9.42	9.39	9.76
②	8.78	9.48	8.85	8.81	9.14
③	9.59	8.72	8.73	8.58	9.16
④	9.52	8.94	8.84	8.69	9.04
⑤	10.13	9.74	9.40	9.31	9.62

位置	試料4	試料5	試料6
①	9.29	9.15	9.19
②	8.69	8.58	8.67
③	8.48	8.28	8.38
④	8.78	8.61	8.58
⑤	9.50	9.16	9.34

位置	試料7端	試料7	試料8	試料9	試料9端
①	9.69	9.31	9.24	9.40	9.81
②	9.28	8.63	8.57	8.81	9.62
③	9.06	8.40	8.41	8.49	9.20
④	9.46	8.91	8.57	8.62	9.22
⑤	9.94	9.46	9.23	9.24	9.73

平均 (kGy)	9.11
中央値 (kGy)	9.16
SD (kGy)	0.39
RSD (%)	4.26
Min (kGy)	8.28
Max (kGy)	10.13
DUR	1.22

図9. 模擬試料（こんにゃく）中の線量分布（4枚重ね 厚さ100 mm）

試料1～9は、本図最上の写真に示したこんにゃくの位置1～9に相当する  
位置①～⑤は4枚重ねたこんにゃくの厚さ方向の位置を示し、①は1枚目の前面、⑤は4枚目の裏面であり③が厚さ方向の中心位置（2枚目と3枚目のこんにゃくの間）となる。

**背景色** 写真中の青丸（側面近く）位置の線量を示す。

（側面に線量計を貼り付けると被照射物の吸収より大きくなってしまうため、端に近いところで2枚のこんにゃくの間に挟んでいる）箱中の試料配置は図6. 下段の写真を参照。



<b>試料 1</b>			<b>試料 2.</b>		
左葉重量：2.74 kg			左葉重量：2.04 kg		
厚さ(最大)：64.4 mm			厚さ(最大)：76.2 mm		
手前 (表)	⑦ 9.24	⑩ 9.19	⑦ 8.94	⑩ 9.06	
	⑧ 9.27		⑧ 8.76		
	⑥ 9.41	⑨ 9.49	⑥ 9.19	⑨ 9.33	
中心	② 9.00	⑤ 8.98	② 8.62	⑤ 8.66	
	③ 8.96		③ 8.59		
	① 9.10	④ 9.01	① 8.66	④ 8.70	
奥 (裏)	⑫ 9.25	⑮ 9.23	⑫ 9.08	⑮ 9.03	
	⑬ 8.94		⑬ 8.96		
	⑪ 9.19	⑭ 9.27	⑪ 9.04	⑭ 9.11	
最大：9.49 kGy 最小：8.94 kGy DUR：1.062			最大：9.33 kGy 最小：8.59 kGy DUR：1.086		

図 1 0. 凍結肝臓試料の線量分布測定結果：肝臓左葉試料の様子（左）、試料内の線量分布（右）

図枠内上段①～⑮は線量計番号、下段数字はアラニン線量計の吸収線量(kGy)を表す。手前：試料前面表、奥：試料裏側表面、中心は肝臓を切り開いた中心面に設置した線量計の番号トートボックス内の配置については、図 6 下段及び図 7 を参照。

表 3. 商業照射施設における肝臓試料(左葉) の殺菌効果と線量測定結果

処理場	試料No	全重量(左葉) (g)	照射した肝臓 の重量(g)	厚さ(最大) (mm)	厚さ(最小) (mm)	Box 番号	線量		菌数(照射前)		菌数(照射後)	
							最小 (kGy)	最大 (kGy)	一般生菌 (CFU/g)	腸内細菌科 (CFU/g)	一般生菌	腸内細菌科
A	190206-1	1508.3	1476.1	42	31	1	8.85	8.96	$1.1 \times 10^3$	$<30$	-**	-
	190207-2 (458)	2008.0	1967.0	50	31	3	9.46	9.51	$2.3 \times 10^3$	$4.5 \times 10^2$	-	-
	190207-3 (471)	1686.6	1654.0	42	34	21	<b>8.69</b>	9.24	<b><math>1.0 \times 10^3</math></b>	$<30$	-	-
	190208-4 (448)	1835.7	1794.0	55	34	23	8.74	9.24	$3.6 \times 10^3$	$<30$	-	-
	190208-5 (473)	2390.4	2350.7	51	29	46	9.46	9.57	$7.4 \times 10^2$	$<30$	-	-
	190208-6 (478)	1961.3	1915.0	44	31	48	9.29	9.51	$1.5 \times 10^3$	$<30$	-	-
B	190227-1	957.8	932.3	39	n. d. *	10	9.02	9.07	$1.9 \times 10^5$	$5.6 \times 10^3$	-	-
	190227-2	1279.6	1253.7	<b>38</b>	n. d.	12	9.24	9.57	$9.0 \times 10^4$	$2.4 \times 10^3$	-	-
	190227-3	1960.4	1934.3	50	n. d.	30	9.40	9.74	<b><math>3.2 \times 10^5</math></b>	$3.9 \times 10^3$	-	-
	190227-4	1397.7	1371.0	54	n. d.	32	9.29	9.40	$8.5 \times 10^4$	$8.1 \times 10^2$	-	-
	190227-5	1769.6	1744.1	<b>57</b>	n. d.	34	9.40	<b>9.90</b>	$1.9 \times 10^5$	<b><math>6.2 \times 10^3</math></b>	-	-

線量：最大；試料の最も薄い部分表面の線量、 最小；試料の最大厚み部分表面の線量

Box 番号：最大 48 個/サイクルセットすることが可能なトートボックスの順番

\*n. d. ： 測定せず ， \*\* - ： 不検出（陰



平成30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

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

研究分担者 岡田由美子

研究協力者 鈴木穂高

研究協力者 野田 衛

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

茨城大学農学部

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

**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、高圧処理後の温度が牛肝臓中の菌数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。300MPa 10分間の高圧処理後に42℃の恒温水槽で1時間の加温処理を行ったところ、一般生菌数は1.43～1.82logの低減を示した。高圧処理のみ行い加温処理を行わなかった検体では、0.59～0.78logの低減に留まり、高圧処理後の加熱処理により高圧処理単独よりも0.83～1.18log低減することが示された。一方、腸内細菌科菌群は処理前の肝臓から0～2.33 log/g、大腸菌は0～2.42 log/g 検出されたが、高圧処理により全検体で検出限界以下となった。高圧処理及びその後の加温処理が牛肝臓の肉質に与える影響を検討したところ、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値が上昇すると共に、赤みを示すa値と黄色みを示すb値も上昇する傾向が見られた。高圧処理後の加温処理によりL値とb値は更に上昇を示したものの、昨年度の検討（42℃での300MPa、5分×3回）に比べ、色調変化は小さかった。以上の結果から、牛肝臓に対して高圧処理後に加温処理を行うことで、細菌数の低減効果を高めることが可能であることが示された。更に、昨年度の検討に比べ、今回実施した条件（300MPa10分1回後に42℃1時間）では肝臓の肉色が白化する傾向をある程度抑制することが可能であった。

#### A. 研究目的

平成23年に我が国で発生した牛肉の生食を原因とする腸管出血性大腸菌集団食中毒事例をきっかけとして、食肉及び内臓肉を生食することの危険性が国内に広く再認識され、食の安全を確保するために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なされた。その一方で、牛肝臓の生食の安全性を確保することによる規制解除の要望も依然として存在する。食肉の微生物汚染は主に表面であることが知られている

が、肝臓においては微生物が表面のみならず内部にも存在しており、肝臓表面の除去及び焼却等の処理では食用部分から微生物の除去は困難である。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ことが必要となる。高圧処理は、非加熱殺菌法の一つであり、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、高圧処理時の温度を上昇させることの効果について検討を行ったところ、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 の低減を示した。一方で、37℃或いは 42℃での高圧処理を行った牛肝臓は肉色の強い白化を示した。今年度は、菌数低減効果を保持しつつ肉色の変化を抑制する条件を見出すことを目的として、室温での高圧処理後に加温処理を行う条件を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 検体

高圧処理実験に用いる牛肝臓は、東京芝浦臓器株式会社から購入し、冷蔵状態で運搬した。肝臓検体は 10 g 片に切断し、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。

### (2) 高圧処理

二重包装済みの検体を Dr. CHEF（神戸製鋼株式会社）を用いて 300 MPa 10 分間の高圧処理を行った。処理温度は、設定圧力到達時の温度が 25℃なるように設定した。

### (3) 加温処理

加温処理は、高圧処理用袋に密封した肝臓検体を 42℃に設定した恒温水槽に 1 時間沈めることで行った。

### (4) 菌数測定

処理後の肝臓検体は 90 mL の滅菌リン酸緩衝液（PBS）を加えてストマッカー処理を行い、10 倍乳剤を作成した。また、必要に応じて PBS を用いて 10 倍階段希釈液を作成した。一般生菌数の測定にはペトリフィルム AC プレート (3M) 及び TEMPO AC (ビオメリュー)、腸内細菌科菌群の測定にはペトリフィルム EB プレート (3M) 及び TEMPO EB (ビオメリュー)、大腸菌の測定にはペトリフィルム SEC プレート (3M) 及び TEMPO EC (ビオメリュー) を用いた。検体希釈液接種後は 35℃で好気培養を行い、24 時間後に集落の計数を行った。

### (5) 硬度及び色調

未処理、高圧処理後、加温処理後及び高圧処理後に加温処理を行った肝臓検体について、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. 高圧処理後の加温処理による菌数低減の効果

牛肝臓に自然汚染している一般細菌、腸内細菌科菌群細菌及び大腸菌について、高圧処理後の加温処理が菌数低減効果に与える影響を調べた。ペトリフィルムを用いた結果では、処理前の肝臓からは一般生菌は 1.82~2.54 log/g 検出されたが、高圧処理後に加温処理を行った検体では、3 検体全てにおいて 1.43~1.82 log/g の菌数低減を示した（表 1）。高圧処理のみで加温処理をしない検体では、0.59~0.78 log/g の低減に留まり、高圧処理後の加熱処理により高圧処理単独よりも 0.83~1.18 log 低減した。加温のみでは、3 検体中 1 検体のみで菌数の低減を示した。腸内細菌科菌群は処理前の肝臓から 0~2.33 log/g、大腸菌は 0~2.42 log/g 検出されたが、高圧処理により全検体検出限界以下となった。腸内細菌科菌群及び大腸菌について TEMPO を用いた結果は、ペトリフィルムを用いた結果とほぼ同等であった（表 2）。

### 2. 高圧処理後の加温処理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、硬度の指標である最大破断点（N 値）は未処理検体では 7.54065 であったが、42℃ 1 時間の加温処理のみでは 6.28387、300 MPa 10 分間の高圧処理のみでは 5.16039 となっており、柔らかくなる傾向が見られた。一方、高圧処理後に加温処理を行った検体では、N 値は 6.17914 となり、高圧処理単独よりも硬化する傾向を示したが、未処理検体よりも柔らかい傾向を示した。色調変化については、42℃での加温処理により、明るさの指標である L 値が 23.3 から 26.6 に増加したものの、赤みの指標である a 値は微減し、黄色みの指標である b 値も 4.9 から 3.9 に減少した。一方、300 MPa 10 分の高圧処理により、L 値は 29.7、a 値は 7.5、b 値は 7.3 に上昇し、未処理検体と比較して明るい色調となった。更に、高圧処理後に加温処理を行った検体では、L 値が 33.6、a 値

が7.0、b値が8.6となり、肉眼による観察でも、高圧処理のみを行った検体より白みが強くなる傾向が見られた。

#### D. 考察

高圧処理後に42°Cで1時間の加温処理温度を行うことにより、高圧処理後に加温処理を行った検体では、3検体全てにおいて1.43~1.82log/gの菌数低減を示した(表1)。高圧処理のみで加温処理をしない検体では、0.59~0.78log/gの低減に留まり、高圧処理後の加熱処理により高圧処理単独よりも0.83~1.18log低減した。腸内細菌科菌群は処理前の肝臓から0~2.33log/g、大腸菌は0~2.42log/g検出されたが、高圧処理後の加温処理を行わなくとも、高圧処理単独で全検体検出限界以下となったことから、一般細菌での高圧処理のみ或いは高圧処理及び加熱処理を行った後に生残していた細菌は腸内細菌科に属するもの以外の菌であると思われた。昨年度実施した高圧処理を3回反復する際の処理温度を42°Cに上昇させる処理に比べ、今年度実施した高圧処理後に加温処理を行う条件の方が肝臓の肉質変化は抑制されていたものの、未処理の検体とは大きく異なる色調を示したことから、生食用の牛肝臓を十分なレベルで殺菌しつつ、肉色の白化を防ぐのは困難であった。

#### E. 結論

高圧処理後の加温処理が、牛肝臓内に存在する微生物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、高圧処理後に42°C1時間の加温処理を行うことで、一般生菌の低減効果を約1log高めることが可能であることが示された。また、今回実施した条件において昨年度検討には及ばないものの、肝臓の色調が白化及び黄化する傾向を示し、高圧処理により生食用肝臓の十分なレベルでの非加熱殺菌と、肉質変化の抑制を両立させるのは難しいことが明らかとなった。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

原著論文：なし

学会発表：

1. 岡田由美子、鈴木穂高、吉田麻利江、荻原博和. 高圧処理による畜産食品中の食中毒原因菌の不活化. 第161回日本獣医学会学術総会. 2018. 9. 12(つくば市)
2. Y Okada, H Suzuki, Y Momose, H Ogihara. Inactivation of foodborne pathogens by HHP treatment in meats. 10<sup>th</sup> International Conference on HPBB. 2018. 9. 19-20. (沼津市)
3. 岡田由美子、鈴木穂高、吉田麻利江、百瀬愛佳、荻原博和. 高圧処理を用いた食肉中の食中毒菌不活化の検討. 第45回日本防菌防黴学会. 2018. 11. 14 (江戸川区)

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表 1. 高圧処理（300MPa10 分×1 回）後の加温処理が牛肝臓内の菌数低減に与える効果（ペトリフィルム）

	肝臓内一般生菌数 (CFU/g)			
	処理前	高圧のみ	温度のみ	高圧+温度
検体 1	1.819544	1.041393	0	0
検体 2	2.206826	1.612784	2.117271	0.778151
検体 3	2.545307	1.959041	2.668386	0.778151
	肝臓内腸内細菌科菌群菌数 (CFU/g)			
検体 1	0	0	0	0
検体 2	1.041393	0	0	0
検体 3	2.334454	0	2.557507	0
	肝臓内大腸菌菌数 (CFU/g)			
検体 1	0	0	0	0
検体 2	0.778151	0	0	0
検体 3	2.416641	0	2.463893	0

表 2. 高圧処理(300MPa10 分×1 回)後の加温処理が牛肝臓内の菌数低減に与える効果 (TEMPO)

	処理前	高圧のみ	温度のみ	高圧+温度
	肝臓内腸内細菌科菌群菌数 (CFU/g)			
検体 1	1.060698	0	0	0
検体 2	0.778151	0	0	0
検体 3	2.49276	0	2.513218	0
	肝臓内大腸菌菌数 (CFU/g)			
検体 1	0	0	0	0
検体 2	0	0	0	0
検体 3	2.644439	0	2.673021	0

図 1. 高圧処理後の加温処理が牛肝臓の肉質に及ぼす影響

高圧 ー, 加温 ー



L 値:23.3, a 値:4.7, b 値:4.9, 硬度:7.54065

高圧 +, 加温 ー



L 値:29.7, a 値:7.5, b 値:7.3, 硬度:5.16039

高圧 ー, 加温 +



L 値:26.6, a 値:4.4, b 値:3.9, 硬度:6.28387

高圧 +, 加温 +



L 値:33.6, a 値:7.0, b 値:8.6, 硬度:6.17914

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
川崎 晋 他	牛肝臓内部における <i>Campylobacter jejuni</i> の $\gamma$ 線照射による殺菌効果 牛肝臓内部における <i>Campylobacter jejuni</i> の $\gamma$ 線照射による殺菌効果	日本食品科学工学会誌	65	259-263	2018
Kawasaki S., et al.	Inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157and <i>Salmonella</i> Enteritidis in raw beef liver by gamma irradiation.	Food Microbiology	78	110-113	2019

平成31年3月28日

厚生労働大臣殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所  
所属研究機関長 職 名 所長  
氏 名 奥田晴宏 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 平成30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）

2. 研究課題名 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）

3. 研究者名 （所属部局・職名）食品衛生管理部 第一室長

（氏名・フリガナ）佐々木 貴正・ササキ ヨシマサ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容： ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



平成31年3月28日

厚生労働大臣殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田 晴宏 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 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)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・部長

(氏名・フリガナ) 朝倉 宏 ・ アサクラ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) 病原体等の取り扱い (所内の管理規定に従って実験を実施)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。





31年 3月 28日

厚生労働大臣 殿

国立研究開発法人農業・食品産業技術

機関名 総合研究機構 食品研究部門

所属研究機関長 職 名 研究部門長

氏 名 鍋谷 浩志



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 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

3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品研究部門・食品安全研究領域長

(氏名・フリガナ) 等々力節子 (トドリキ セツコ)

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項) 病原体等の取扱い(所内の管理規定に従って実験を実施)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所  
所属研究機関長 職 名 所長  
氏 名 奥田晴宏 印

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部 第三室長  
(氏名・フリガナ) 岡田 由美子 (オカダ ユミコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) 病原体等の取扱い(所内の管理規定に従って実験を実施)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。