

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28年度～30年度 総合研究報告書

研究代表者 佐々木 貴正

平成31(2019)3月

目次

I. 総合研究報告

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. 総合分担研究報告

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	-----	26
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	-----	36
3. 放射線照射による微生物除去 等々力 節子 他	-----	44
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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	64
---------------------	-------	----

平成28－30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

百瀬 愛佳 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

吉田麻利江 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

藤森亜紀子 岩手県食肉衛生検査所

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

戸嶋 章湖 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

安達 俊輔 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

渡邊 真弘 一般財団法人日本冷凍食品検査協会

(敬称略、順不同)

平成28-30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：牛肝臓内部の 0157 汚染が明らかとなったことから、牛肝臓の生食用としての提供・販売が 2012 年 7 月 1 日に禁止された。しかし、生食に対する要望は依然として存在し、現在でも生食用として牛肝臓を提供した飲食店が摘発されている。そこで、牛肝臓の生食に対する要望に応ずべく、牛肝臓の生食用としての提供・販売の再開を検討するための研究を 3 年間実施した。本研究の目的は、①肝臓内部の細菌汚染実態の解明、②摘出後肝臓の細菌動態、③殺菌技術（放射線照射及び高圧処理）の確立に関する科学的データを集積することであった。

肝臓内部の細菌汚染に関しては、可能な限り衛生的にとたいより肝臓を摘出した場合には、肝臓内部の腸内細菌科菌群等の最大菌数(CFU/g)は 10^4 オーダーに留まっており、肝臓を生食するためには殺菌能力が 10^5 CFU/g 以上の殺菌技術が必要であることが判明した。また、このような高濃度の汚染が見られる場合には、胆汁からも腸内細菌科菌群が検出されること、胆汁と肝臓内部の細菌叢に関連性があることが明した。さらに、通常出荷時に採取した肝臓では、細菌汚染の程度が前者よりも高い傾向がみられた。摘出後肝臓の保管状態による細菌動態への影響については、摘出直後の肝臓内部温度は約 39°C もあり、丸ごとを冷蔵した場合、 20°C になるまで約 4 時間を要したことから、その間に細菌が増殖すると考えられた。一方、冷凍保管 (-30°C) した場合には所要時間が 2 時間 30 分に短縮され、さらに、カット (8 (厚さ) X10X20cm) した場合には 2 時間以内で達成できることが判明した。また、志賀毒素産生性大腸菌 0157 及びサルモネラは、胆汁中で増殖できることが確認され、肝臓摘出後は、速やかに小分けし、冷凍することが望ましいと考えられた。殺菌技術については、高圧処理では、生と同等の品質を保持できる条件下で 10^5 CFU/g の殺菌効果を得ることはできなかったが、放射線（ガンマ線）照射では、冷凍した肝臓に 8.2~8.5 kGy を照射することにより、生の品質を保持した状態で 10^5 CFU/g のサルモネラを 95~99%の信頼度で死滅させることができる可能性、肝臓の厚さが 10 cm以下であれば、この線量以上 10kGy 未満の範囲で照射できる可能性が示唆された。さらに、商業施設の連続搬送設備を用いても、この線量範囲での照射が実現可能と考えられた。ただし、効率的な連続照射を行うためには、試料のかさ密度や配置を照射施設ごとに精緻に規格化し、その妥当性を検証する手順を定めることが必要であると考えられた。

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
百瀬愛佳 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
吉田麻利江 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
藤森亜紀子 岩手県食肉衛生検査所
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
戸嶋章湖 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
安達俊輔 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
渡邊真弘 一般財団法人
日本冷凍食品検査協会

A. 研究目的

牛ユッケ等の生食により 2011 年に発生した大規模集団食中毒事例を受けて、牛生食肉による健康被害の調査が行われ、専門家による議論を通じ、生食用食肉に対し製造基準及び成分規格が定められた。さらに、2012 年には肝臓内部からの 0157 の検出が報告され、生食用食肉の製造基準である表面加熱が、牛肝臓での細菌汚染除去には無効という結論がなされ、その結果、牛肝臓については生食用としての提供・販売が禁止された。しかし、消費者からは牛肝臓の生食に対する要望がある。これら背景より、本研究では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。その成果は非加熱殺菌技術を用いた手法の有効性評価試験を行う上での低減目標設定に用いられるとともに、食肉処理段階での牛肝臓の適切な処理法に関する知見の創出が期待される。

また、必要なレベルの肝臓内部の微生物汚染の低減を実現するための非加熱殺菌法の検討を行う。放射線照射による牛肝臓内部の食中毒菌への殺菌効果を明確にするとともに、商業実用の可能性を評価する。牛肝臓の放射線殺菌の研究は当該グループ以外報告がなく、先行研究で主な食中毒細菌のガンマ線に対する感受性比較や脂質成分に対する影響等を初めて明らかにした。

本研究では、より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による殺菌効果についても検証する。高圧処理は、放射線照射と同じ非加熱殺菌法の一つであり、海外では食品加工法の1つとして利用されている。

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）。

肝臓の採材にあたっては、平成28・29年度は、食肉センターでとちくされたと体より、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。平成30年度は、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）、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、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。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°C 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（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°C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°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、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.~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、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0.5cm刻みで行った。

2.3. 肝臓内部の温度変化

冷蔵室における温度変化の測定は、丸ごとの場合には、⑧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、冷蔵室で翌日の出荷までの間の温度を経時的に計測した。小分け冷蔵条件及び冷凍条件の場合には、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4cmの部分に温度ロガー（おんどとり）を取り付けて、冷蔵室（4℃）又は冷凍庫（-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。

まず、事前検討試験として、ミューラー・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）。

次に、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、3M社製のペトリフィルム（EBプレート）に各濃度2枚に1mL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、3M社製のペトリフィルム（EBプレート）に各濃度2枚に1mL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1mLを1.5mL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

3.1. 材料

微生物接種試験用の牛肝臓試料は、と殺直後に凍結した牛肝臓を用い、25gの大きさ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。

実用照射に向けた線量分布の検討では、牛肝臓の左葉部分を用いた。また、微生物試験を行う場合は、と畜場にてと殺直後に臓器を取り出し、直ちに肝臓より左葉（約0.9kg～2.74kg）を切り出して急冷後に農研機構に輸送した。入手した左葉は微生物検査用に一部をサンプリングし、その後、脱気包装し、-80℃で凍結保存して用いた。

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（14×7.5×2.5cm 密度約0.988g/cm³）を用いた。

3.2. 供試菌株

供試菌は、*E. coli* 0157 DT66 株及び *S. Enteritidis* IF03313 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（4,000 × 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。

3.3. ガンマ線照射

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）のコバルト 60 ガンマ線照射施設（7 セル）にて静置の両面照射を、あるいは、②コーガイソトープ株式会社コバルトガンマ線照射用 1 号機または 3 号機にて、トートボックスを用いた搬送により連続照射を行った。

①量研・高崎研における照射では、1) 肝

臓 (25g) を用いた微生物接種試験、および
2) 肝臓左葉全体の線量分布試験を実施した。
試料を入れた箱を、板状線源に対する距離
と高さ位置を合わせて照射室内に設置し、
半分の照射時間で箱内の肝臓試料を裏返し、
両面から照射を行った。それぞれの試験に
おける、試料の設置方法の詳細は、H29 年
度分担研究報告書 (図 1 及び図 2 上段)、お
よび H30 年度報告書 (図 4) に示した。ま
た、線量率は約 2.5 kGy/h、あるいは 1.5
kGy/h であった。

②の商業用施設では、1) 模擬試料による
線量分布予備試験、2) 肝臓左葉試料の線量
分布測定試験、3) 自然汚染状態の左葉の殺
菌効果確認試験の 3 つの試験を実施した。
この施設に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) が設置
されており、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 ×
幅 46 cm 高さ 89 cm) を用いる連続搬送
設備が付属している。当該施設における、
試料搬送の仕組みやトートボックス内の
線量分布については、H30 年分担研究報告
書 B. 方法の 2 項、および 図 1. に詳細
を記載した。なお、試料を凍結状態で照射
する際には、照射中の温度を一定に保つた
ため、肝臓試料の前面 (γ線照射方向) を遮
らないよう、試料の背面あるいは上部から
ドライアイス当て、全体を発泡スチロー
ルの容器に入れた。

3. 4. 接種試験による牛肝臓の殺菌効果確認

菌体の接種は、自然解凍した 25 g 塊の
牛肝臓の内部に、供試菌液 100 μL 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、 $10^4 \sim 10^7$ 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°C の冷凍
庫内で 2 時間以上放置して温度を一定に
した後、目標線量 4~12 kGy で、①量研 高
崎研にて、ドライアイス冷却下でガンマ線
照射した。

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。
また、箱内試料 (25g) の吸収線量の分布は、
予め、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、室
温で照射して測定した。アラニンペレッ
トの信号は、ESR 装置 (Bruker EMx-Plus)
で測定し、検量線は英国の National
Physical Laboratory (NPL) の標準アラニ
ンペレットで作成した。

3. 5. 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) を厚み方向の中心で 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、
それぞれ 5 つずつ線量計を張り付けた (H30
分担研究報告 図 2)。また、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、それぞれの切り身の間および、皿表面に線量計を装着し、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。この試料を2皿分（肝臓重量：84.6g 及び 87g）作成した（H30 分担研究報告 図3）。

左葉試料および2皿分を重ねた切り身試料の厚み方向の中心位置を揃えて発泡スチロール箱に入れ、量研・高崎の照射室（7セル）にて、線源保護板から肝臓の厚さ中心までの距離を30cm、高さ中心を22.5cmとなるように設置し、室温にて両面から照射を行った（H30 分担研究報告 図4）。

吸収線量は、前項4. と同様のシステムを用い、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）に取りつけたアラニン線量計（アミノグレイ、日立電線株式会社）と肝臓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）により確認した。

3.6. 商用施設における連続搬送時の線量分布の予備試験

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段重ね（厚さ2枚分、50mm）または、4段重ね（厚さ4枚分、100mm）の長方体となるように固定し、肝臓の模擬試料とした。この試料の面方向及び厚さ方向の線量分布を測定するため、アルミ蒸着シートに封入したアラニン線量計を各こんにやくの表面及び重ね合わせたこんにやくの間の位置に張り付けた（H30 分担研究報告書 図5）。

作成した長方体の模擬試料（縦22cm × 横42cm 厚さ：50mm または 100mm）を、発泡スチロール箱の中央に立てるように設

置し、さらに、この箱を、照射装置付属のトートボックスの指定位置に収まるように配置した（H30 分担研究報告書 図6.）。厚さ50mm（2段重ね）の試料は、厚さ方向の透過力とトートボックス内の位置を大まかに把握するために、トートボックス内に発泡スチロール箱を2つ重ねて入れ、1周で約10kGy となるように搬送速度を固定している1号機の照射サイクルに合わせて1周（約1時間）の照射を行った。また、厚さ100mm（4段重ね）の試料は、同型のトートボックス内の高さ方向の中心に発泡スチロール箱を1つだけ入れ、最小目標線量を8.2kGy となるよう、3号機を用いて、搬送サイクルタイム2分5秒で8周照射した。なお、1号機と3号機は、トートボックスの形状や線源との位置関係はほとんど同等で、箱内線量分布もほとんど同じと考えられるが、コバルト60の数量の違いにより、線量率が異なっている。1号機は、高線量率であり、1周の照射を決められた目標線量となるようなサイクルで運転されていることが多い。本研究では、100mm厚さの模擬試料については、最低線量を8.2kGyに合わせるため、低線量率の3号機を用いて、サイクルタイムの調節を行った。なお、模擬試料の照射は、いずれの装置を用いた場合でも室温で実施した。

線量測定は、同商用施設におけるESR測定装置（ブルッカー社製 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の測定により実施した。また同施設でNPLと比較校正して作成した検量線を用いて線量を決定した。線量計の測定は室温で実施した。

3.7. 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 4. と同様に、アルミ蒸着シートに封入したアラニン線量計を中心部及び脱気包装後の表面に取り付けた。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 バンドで固定し、予備照射と同形の発泡スチロール箱の中央に立てて設置し、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、板状線源と平行のガンマ線照射面を遮らないようにドライアイス板を試料の上面に配置した。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で詰めた発泡スチロール容器は、1つずつトートボックス中に配置し、厚さ 100mm の模擬試料と同様に 3号機を用いて、コンベアにより、サイクルタイム 2分5秒で搬送し、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、ドライアイス温度下で、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。

3.8. 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、冷蔵状態で農研機構に輸送し、入手直後（と畜後 2日目）、方形葉側の一部（25g）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°C 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、前項と同様の配置で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。肝臓検体が入っていないボックスには、約 2 kg 分の板状の氷を中心に入れた発泡スチロール箱をダミーとして、装填した。照射装置は前項 7. 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。

3.9. 微生物検査

照射前の肝臓検体は、25g を 225mL の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、225mL の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て一昼夜培養した。接種試験の際に、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* 0157 および *Salmonella* 同定キット（Singlepath *E. coli* 0157; Merck Single path *Salmonella*; Merck）に供し、典型集落が *E. coli* 0157 もしくは *Salmonella* 属であることを確認した。

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. 供試菌株

平成 28 年度の検討では、*Salmonella* Typhimurium LT2 株、*Salmonella enterica* JCM1651 株、*Salmonella enterica* JCM1652 株、enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) HP1001 株、enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) WH01 株、enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) EDL933 株及び enteroaggregative *E. coli* (EAEC) PEZ 株を用いた。サルモネラ菌株及び病原性大腸菌株は-80 °C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 °Cで 20-24 時間静置培養したものを高圧処理試験及び牛肝臓への添加試験に供した。平成 29 年度の検討では、*S. enterica* の内前年度の検討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。

4.2. 検体

菌液を用いた高圧処理試験では、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。

高圧処理を行う牛肝臓は、芝浦臓器株式会社から購入し、冷蔵状態で運搬した。接種試験用の検体は 10 g 片に切断し、滅菌した高圧処理用袋に分包後、菌液を接種した。バキュームシーラーを用いて袋をシールしたのち、滅菌蒸留水を入れた外袋内で更にシールして密封した。硬度及び色彩を測定する肝臓検体は 25 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。

4.3. 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（平成 28 年度報告書図 1：神戸製鋼株式会社）を用いて 250 MPa 及び 500 MPa での高圧処理を行った。

牛肝臓中に接種した病原菌に対する殺菌効果の測定のための高圧処理は、300 MPa、5 分を 2 回反復する条件で行った。処理温度は-20 °Cから 20 °Cの範囲に設定した。高圧処理前後の温度は、-20 °Cから 4 °Cの範囲に設定した。

高圧処理による牛肝臓の硬度及び色調の変化を測定するため、菌を接種しない肝臓検体に 250 MPa、300 MPa 及び 400 MPa の圧力で 5 分間処理する条件で行った。処理温度は-20 °C又は 4 °Cの範囲に設定した。高圧処理前の温度は、-80 °Cから 4 °Cの範囲に設定した。平成 29 年度の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 °Cから 42 °C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。平成 30 年度は、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 °Cなるように設定した。

4.4. 加温処理

平成 29 年度の牛肝臓における加温下での高圧処理の対照群として、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。平成 3 年度の加温処理は、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。

4.5. 菌数測定

平成 28 年度の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 μ L をサルモネラ属菌では BHI 寒天平板及び CHROMagar サルモネラ平板に、病原大腸菌では BHI 寒天平板及び TBX 寒天平板に塗布後、37℃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。牛肝臓中に接種したサルモネラ属菌に対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を 9 倍量の滅菌生理食塩水中でストマッカー処理して 10 倍乳剤を作成し、各 100 μ L を BHI 寒天平板及び CHROMagar サルモネラ平板に塗布後、37℃で好気培養を行い、24 及び 48 時間後に定型集落の計数を行った。平板に発育した定型集落数と希釈倍率から、高圧処理前及び処理後の検体中の菌数を算出した。病原性大腸菌の殺菌効果の測定は、サルモネラ属菌と同様に 10 倍乳剤を作成し、BHI 寒天平板及び TBX 寒天平板に塗布後、37℃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。平成 29 年度の菌液

を用いた高圧処理試験では、平成 28 年度と同様に菌液の塗布を行ったのち、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。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。

4.6. 硬度及び色調

未処理、高圧等の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

平成 28~29 年度には食肉センターでとちく解体された計 124 頭の肉用牛の肝臓等を、平成 30 年度には通常処理された出荷前の肉用牛計 70 頭の肝臓等を対象として、衛生指標菌の定量試験並びに代表的な病原細菌である腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌の定性試験を実施した。

1.1. EHEC 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、平成 28 年度から 29 年度にかけて衛生的に採材した計 124 頭×6 部位=744 検体は EHEC 及びサルモネラ属菌陰性を示した。

一方、平成 30 年度に採材した出荷前の計 70 頭×6 部位=420 検体のうち、1 頭では表面及び実質右葉外側の 2 検体、もう 1 頭では肝臓内部左葉 2 検体で V T 遺伝子が検出された。前者の検体（表面）では 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) 平成 28 年度成績

(i) 細菌数

表面拭き取り検体では 34 検体中 29 検体が陽性を示し（陽性率 85.3%）、陰性検体も含めた全体の平均値は 2.6×10^4 CFU/100cm²（最大値： 6.8×10^5 CFU/100 cm²）であった。

胆汁検体については、計 5 検体が陽性を示し（陽性率 14.7%）、最大値は 4.7×10^1 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、それぞれ 4 検体（陽性率 11.8%）および 5 検体（同 14.7%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 5.0×10^4 CFU/g、陰性検体も含めた全体の平均値は 5.9×10^2 CFU/g であった。

(ii) 腸内細菌科菌群

表面拭き取り検体では、10 検体から腸内細菌科菌群が検出され（陽性率 29.4%）、最大値は 2.5×10^5 CFU/100cm² であった。

胆汁検体については、3 検体が陽性となり（陽性率 8.8%）、最大値は 3.0×10^1 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、4 検体（陽性

率 11.8%）および 5 検体（同 14.7%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 2.9×10^3 CFU/g であった。

(iii) 大腸菌群

表面拭き取り検体では、5 検体から大腸菌群が検出され（陽性率 14.7%）、最大値は 7.4×10^3 CFU/100cm² であった。

胆汁検体では、2 検体が陽性となり（陽性率 5.9%）、最大値は 5.0×10^0 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、共に 3 検体（陽性率 8.8%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 1.4×10^3 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 4 検体（陽性率 11.8%）あり、最大値は 1.3×10^2 CFU/100cm² であった。胆汁検体は全てが検出限界以下であった。

実質左葉・右葉検体では、0 検体および 2 検体（陽性率 5.9%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 1.0×10^2 CFU/g であった。

2) 平成 29 年度成績

(i) 細菌数

表面拭き取り検体では、計 93 頭分のうち 82 頭で陽性を示し（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（最大値： 1.2×10^5 CFU /100 cm²）であった。

胆汁検体では、計 13 頭が陽性を示し、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%）で陽性となり、実質全体の最大値は、 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。

3) 平成 30 年度成績

(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 4.9×10^4 CFU/100cm² (最小値: 2.0×10^1 CFU/100cm²、最大値: 1.1×10^6 CFU/100cm²)

であった。

胆汁検体は計 15 頭が陽性を示し、最大値は 3.6×10^7 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、 9.6×10^4 CFU/g、陰性も含めた全体の平均値は 1.1×10^3 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 2.9×10^5 CFU/100cm² 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 1.1×10^7 CFU/mL であった。

実質は、左葉のみ陽性が 3 頭 (最大値 6.2×10^2 CFU/g)、右葉のみ陽性が 5 頭 (最大値 8.0×10^1 CFU/g)、両葉とも陽性が 8 頭 (最大値 7.1×10^4 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 2.3×10^5 CFU/100cm² 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 8.0×10^6 CFU/mL であった。

実質では、左葉のみ陽性が 2 頭 (最大値 2.9×10^3 CFU/g)、右葉のみ陽性が 8 頭 (最大値 1.6×10^2 CFU/g)、両葉とも陽性が 9 頭 (最大値 3.4×10^4 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 2.3×10^5 CFU/100cm² であ

った。季節別では、夏季が15頭、冬季が9頭でそれぞれ陽性を示した。

胆汁は6頭が陽性となり(陽性率8.6%)、最大値は 6.8×10^6 CFU/mLであった。

実質では、左葉のみまたは右葉のみ陽性が各2頭(最大値 2.9×10^2 CFU/gまたは 6.0×10^1 CFU/g)、両葉とも陽性が4頭(最大値 8.6×10^4 CFU/g)認められた。

1.3. 腸内細菌科菌群の胆汁及び肝臓内部における分布の相関性

平成30年度に得られた成績として、胆汁中で腸内細菌科菌群陽性を示した個体(7頭)では肝臓内部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頭は肝臓内部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、肝臓内部における同指標菌数は最大で 6.4×10^3 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、肝臓内部から 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 8.1×10^5 CFU/mL、肝臓内部 6.2×10^2 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、肝臓内部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。

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5~8.5cmであるが、8割は6~8cmの間であった。8cm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8.5cm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°Cであり、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(H29年度調査)。一方、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時間以内で20°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。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。

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 10^6 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

3.1. 接種試験における微生物の殺菌効果

接種試験に先だって、試験用の牛肝臓試料 (25 g, 厚さ約 14mm) の線量分布を確認した。発泡スチロール容器 (436 mm (横) × 276 mm (縦) × 136 mm (奥行き))、内径 (400 mm (横) × 240 mm (縦) × 100 mm (奥行き)) の蓋の裏側に線量計をつけて包装した肝臓 10 個を密着するように 2 段に 5 個ずつ配置し、肝臓試料の距離方向の中心位置を線源から 22cm、試料箱の高さ方向の中心位置をコバルト線源の中心位置 (22.5cm) に合わせて板状線源の正面に設置した (H29 分担研究報告 図1. および図2)。目標線量約 10 kGy として、半分の照射時間で肝臓試料の前面後面を反転して両面照射を実施した結果、10 個の肝臓試料の中心部および表面も含め吸収線量は、全体で 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 1.06 が得られた。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 0.98~1.03 となり、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た。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。

牛肝臓に $10^4 \sim 10^7$ CFU/g の *E. coli* 0157 ならびに $10^5 \sim 10^7$ CFU/g の *Salmonella* を接種し、ドライアイス下、脱気包装条件でガンマ線照射し、規定の線量で死滅が可能か否かを検討した。前研究課題においては、一定菌数 (10^8 CFU/g レベル) の細菌を肝臓に接種して線量を変えた照射を行い、その生残菌数とガンマ線の吸収線量の関係から、*E. coli* 0157 あるいは *Salmonella* の推定死滅曲線を得ており、その際の反復試験により、95% および 99% 予測信頼区間を算出した。

E. coli 0157 では、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% 信頼区間外の高いガンマ線の照射域では全ての検体で不検出となった。

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% 信頼区間外の高いガンマ線照射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。

なお、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、の自然汚染検体 (1 頭分の牛肝臓) から切り分けた 5 個の試料 (25 g) について、接種試験と同様の配置で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。

3.2. 静置照射における牛肝臓の線量分布

重量約 1,800 g、縦 20 cm × 横 25 cm、最大厚さ 50 mm の肝臓左葉および総重量 85 ~ 90 g の肝臓を 5 枚の切り身にして縦 10 cm × 横 7 cm のトレーに乗せて厚さ 10 mm に包装したパックを 2 つ重ね、厚さ方向を板状線源の正面に向けて両面照射した。照射方向の厚さが 20 mm で、ほぼ長方体状に包装された肝臓小片に取り付けた線量計の最大/最小値の比は 1.05 ~ 1.06 程度であった。一方、肝臓左葉の吸収線量の最大/最小比は 1.10 と、小型パッケージの肝臓小片より大きな分布となったが、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 (H30 分担研究報告表 1)。以上、量研・高崎研での肝臓小片を用いた均一な照射により、吸収線量と微生物の低減レベルの関係を明らかにし、サルモネラおよび *E. coli* 1575 桁低減に必要な線量予測を検証することができた。また、肝臓左葉全体でも、サルモネラの 5 桁低減に必要な線量範囲 8.2 kGy ~ 10 kGy の照射の実施可能性が示された。

3.3. 連続照射 (商業施設) における模擬試料及び牛肝臓左葉の線量分布

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) 58 cm × 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。このボックスを用いて連続照射を行っ

た際の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するため、ガンマ線の照射方向に対して厚さ 50 mm となるように、模擬試料のこんにやく (密度約 0.988 g/cm³) をボックス中心に配置し、1 号機で照射した際の線量分布測定を行った。その結果、こんにやく層における線量の最大/最小比は 1.14 であり、サイクルタイムを適切に設定すれば 10⁵ CFU/g のサルモネラを不活化するのに必要な線量、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 (H30 分担研究報告図 8、表 2)。一方、模擬試料の厚さを 100 mm とし、3 号機を使って最小線量を 8.2 kGy となるようにサイクルタイムを設定して照射した場合の線量はより広範に広がった。最小線量は面方向の中心位置の厚さ中心で、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、最大最小比は 1.22 となった。

模擬試料の線量分布の確認結果から、80 mm より薄い試料であれば、目的とする線量範囲での照射が可能と考え、最大厚さ 64 mm および最大厚さ 76 mm の 2 つの肝臓を、模擬試料と同等の位置になるように、2 つのトートボックスのそれぞれに 1 つずつ、凍結状態で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。試料の装てん位置および搬送条件は、100 mm 厚さの模擬試料の条件を再現し 3 号機を用いて照射を行った。ただし、照射中の温度を保つため、照射方向を遮らないよう試料の上側にドライアイスを搭載して冷却した。照射の間に測定した試料温度は -67.9°C ~ -70.1°C であった。線量測定の結果、2 つの肝臓の線量範囲は、8.59 kGy ~ 9.49 kGy、最大/最小

比 1.10 となった。(H30 分担研究報告 図 10) 以上より、連続プロセスにおいても量研・高崎研で得られた範囲内で線量の制御が可能と結論された。

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 3 号機にて照射した。照射した検体の重量は、932g ~ 2,350g、寸法 約 27~32 cm × 17~28 cm、最大厚さが 38 mm~57 mm 程度であり、厚さ最大部分と最小部分の肝臓表面に取り付けた線量計の線量範囲は、8.69 kGy ~ 9.90 kGy、最大/最小比は、1.14 であった。

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 7.4×10^2 CFU/g ~ 3.6×10^3 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 4.5×10^2 CFU/g、処理場 B では、一般生菌数 8.5×10^4 CFU/g ~ 3.2×10^5 CFU/g、腸内細菌科菌群 8.1×10^2 CFU/g ~ 6.2×10^3 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 (H30 分担研究報告書 表 3)。

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. サルモネラ属菌と病原大腸菌の菌株間での高圧耐性

サルモネラ属菌 3 菌株と、病原大腸菌 4 菌株について、250 MPa 及び 500 MPa の

高圧処理後の生残性を測定することにより、高圧耐性の比較を行ったところ、サルモネラ属菌では JCM1652 株が 250 MPa 及び 500 MPa における生残性が最も高い結果を示した。病原大腸菌では、EHEC EDL933 株が 250 MPa 及び 500 MPa における生残性が最も高い結果を示した。EHEC EDL933 株は他の株と比べ、500 MPa 処理後の非選択培地上の集落数と選択培地上の集落数の差が少なく、検討した株の中で損傷菌となりにくい傾向が最も強かった。以上の結果より、牛肝臓への接種試験にはもっとも強い高圧耐性を示した *S. enterica* JCM1652 株と EHEC EDL933 株を用いた。

4.2. 高圧処理前後の保管温度がサルモネラ属菌及び病原大腸菌の菌数低減に及ぼす影響

牛肝臓に接種したサルモネラ属菌は 1.26~2.15 log、病原大腸菌は 1.41~2.22 log の低減を示した。サルモネラ属菌は高圧処理前に検体を -20°C で保管した場合に、菌数低減効果が高くなる傾向がみられた。一方、病原大腸菌では、処理前後の冷凍保管による菌数低減効果は見られなかった。サルモネラ属菌、病原大腸菌のいずれにおいても、高圧処理後の選択分離培地の集落数は非選択培地上よりも著しく低く、高圧処理により損傷菌が発生していると思われた。

4.3. 高圧処理が牛肝臓の色調と硬さに及ぼす影響

処理前に 4°C で保管し、高圧処理を 4°C で行った場合、硬さを示す最大破断点の

加重は、圧力に比例して高くなる傾向を示した。処理前に検体を -20°C で保管し、 4°C で高圧処理を行った場合は、いずれの圧力でも硬さが同程度増す傾向が見られた。一方、処理前に検体を -80°C で保管し、 -20°C で高圧処理を行った場合、250 MPa の処理では検体の硬さに大きな変化はなく、400 MPa の処理後の検体が柔らかくなる傾向が示された。牛肝臓の肉色については、処理前に 4°C で保管し、高圧処理を 4°C で行った場合、明るさを示す L 値、赤みを示す a 値及び黄みを示す b 値共に、圧力に比例して高くなる傾向を示した。処理前に検体を -20°C で保管し、 4°C で高圧処理を行った場合は、250 MPa 及び 300 MPa において L 値、a 値及び b 値共に、 4°C 保管時よりも数値が高くなる傾向が見られた。一方、処理前に検体を -80°C で保管し、 -20°C で高圧処理を行った場合、250 MPa の処理では L 値の低下が見られた。また、高圧処理後の牛肝臓は、圧力に比例して切断端が丸みを帯びる形態変化が見られた。高圧処理を行わない場合の冷蔵及び冷凍保存による肝臓の肉質変化は、特に認められなかった。

4. 4. 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°C で $1.5\sim 2.1\text{ log}$ 、 37°C で $3.2\sim 3.6\text{ log}$ 、 42°C で $5.2\sim 6.4\text{ log}$

の低減を示した。リステリアモノサイトゲネスでは、 25°C で $6.0\sim 6.6\text{ log}$ 、 37°C で $7.0\sim 7.7\text{ log}$ 、の低減を示し、 42°C 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。

4. 5. 高圧処理時の温度が牛肝臓の肉質変化に及ぼす影響

4. 4. と同じ条件で牛肝臓の高圧処理を実施したところ、 25°C 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°C 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°C の処理では 3. 608 から 1. 542 と大幅に軟化した。高圧をかけない加温のみの処理では、 37°C で 5. 780 から 3. 218、 42°C 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°C 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°C 及び 42°C の処理においても同様の傾向を示したが、 25°C 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。

4. 6. 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 CFU/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 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、0.59~0.78 log 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 CFU/g、大腸菌は 0~2.42 log CFU/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. 7. 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. 6. 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°C 1 時間の加温処理のみ

では 6.28387、300MPa 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°C 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、300MPa 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

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実施した。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 38~40°C 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、肝臓内部に細菌汚染があった場合には増殖する可能

性がある。このような現状を考慮して研究を計画的に遂行した。

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は、腸内細菌科菌群が糞便汚染指標として国際的に広く用いられている。同指標菌は、平成 28～29 年度には計 17 頭 (17/122) の肝実質計 16 頭の肝実質より検出され、その最大値は 7.1×10^4 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、高率に肝臓内部に腸内細菌科菌群を認めた施設では、検査から保管に至る時間が約 2.5 時間を要していた、または検査後には洗浄冷却を十分行わずに保管する等の処理工程を行っていたため、これらの施設で処理された肝臓内部温度は他施設に比べ、穏やかな冷却を呈したと想定される。すなわち、腸内細菌科菌群の増殖制御には肝臓等の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結果となった。

加えて、別施設では処理過程で、臓器別に異なるカゴを用いて区分化を図っていたが、白物を最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。

胆汁及び肝臓内部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、肝臓表面、胆汁、肝臓内部で認められた。肝臓内部への細

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、細菌が肝臓内部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、肝臓内部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が必須の課題と思われる。

肝臓摘出後に細菌汚染の拡大を防止するためには、肝臓内部の温度を急速に低下させる必要があるが、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り、その速度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。今回の研究では、厚さを8 cmにした場合、冷凍庫(-30°C)保管で20°C(サルモネラがムーラー・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。しかし、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ことを考慮し、小分け時の大きさを決定する必要がある。なお、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。

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。

放射線照射による肝臓内部の殺菌に関しては、前課題において、一定菌数(10^8

CFU/gレベル)の*Escherichia coli* 0157 DT66株もしくは*Salmonella* Enteritidis IF03313株を接種した小型(25g、厚さ14mm)の肝臓片に、線量を変えた照射を行い、生残菌を計数することで、線量と生残菌数の対数の直線回帰から、それぞれの菌種に対する D_{10} 値を得た。しかし、低減目標(例えば 10^5 CFU/gレベル)の菌数を接種した検体を規定の線量で処理した場合に完全に死滅するか否かについては、さらなる確認が必要と考えた。前課題で得た生残菌数のばらつきから、生残曲線の95%および99%予測信頼区間を算出し、特定の菌数を完全に死滅させる線量を予測できると考え、95%および99%予測信頼区間と増菌培養による生残判定の結果を合わせて評価した。その結果、*E. coli* 0157は95%、*Salmonella*は99%予測信頼区間上限よりも高い線量域で照射した際の生残は認められなかった。従って、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の線量を決定することは妥当と判断した。次に商業施設での実行可能性を検討するため、量研・高崎研の照射室(7セル)において、厚さ50mmの左葉検体を線源保護板から30cmの距離で両面から照射した。その結果、線量の最大/最小比は1.10であり、厚さを20mmに薄く整形したパッケージに比べて分布範囲は広がるが、左葉全体を照射しても線量範囲8.2~10 kGyでの照射が十分可能と判断された。また、通常、商業ベースで受託サービス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により、定められた搬送経路により、

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。トートボックスは施設ごとにことなる大きさを持っており、また、ボックス内の照射試料の位置やボックス内の試料形状などの影響により、吸収線量に分布がある。連続搬送においても、厚み方向の分布を小さくするためには、トートボックスの横幅中心に左葉の厚さ中心を揃え、左葉の両面を板状線源と平行の向きに立てるように配置することが有効と判断された。

本研究では、厚さ 50mm と 100mm の長方形の模擬試料を使って、ある商業施設において、トートボックス内の指定位置に試料を固定する方法を考案した。模擬試料内の線量分布結果から、厚さ 80mm 程度の肝臓左葉であれば、当該施設において 8.2~10 kGy の範囲での照射が可能と予測した。実際、凍結した牛肝臓左葉(最大厚さ 64mm および 72 mm) を厚さ 100mm の模擬試料と同位置に配置し、上部からドライアイスで冷却して、模擬試料と同じ搬送条件で照射したところ、線量範囲は 8.59 kGy ~ 9.49 kGy に収まり、試料温度も -67.9°C ~ -70.1°C に保つことが可能であった。そこで、均一な照射場でバッチ式に照射した場合と同様に、連続プロセスにおいても菌数低減の達成度を満たすことが可能と判断した。但し、今回実測した線量は、ドライアイス下で作成した検量線に基づいて測定しているため、実際の照射時の温度条件と検量線作成時の温度のばらつき等の条件を考慮すると、不確かさが常温による測定より大きくなり、正確な評価が難しいため、ドライアイス下での照射プロセスの線量の妥当性の評価には、さらなる検討を要する。

微生物検査のために、最大厚さが 38~57 mm の 11 検体の肝臓左葉を、同上の運転条件で照射した際には、最大線量は 9.9 kGy となり、表面に貼り付けた線量計の線量範囲だけでも、最大/最小比は 1.14 と大きくなった。この照射条件では、左葉の最大厚さ部位の内部の線量が最小に、最小厚さの部位の表面の線量が最大となるとが予測される。従って、線量計を設置していない左様の内部の線量が、測定した最小線量より、さらに小さくなる可能性がある。但し、肝臓左葉の照射プロセスの実施条件は、厚さが 100mm の模擬線量の中心部の最低線量が、8.2 kGy を上回る条件(実測値は 8.23 kGy)と同様に設定しており、搬送条件と試料位置が再現出来ていれば、厚さが 100mm より十分小さい左葉検体の内部は、目標最低線量の 8.2 kGy より大きな線量が照射されていると推定できる。最大線量の 9.9 kGy は、仮に上限線量を 10 kGy とした場合には、線量測定の不確かさを加味した場合に十分な余裕が無い。線量分布の広がりや、検体数を増やしたことで、個体間の厚さや形状のばらつきが大きくなったことや、多数のボックスを使用する際のボックス間の相互作用、試料位置の再現性の低下などが原因と考えられ、線量分布をより小さくする工夫が必要となる。また、実試料(製品)では、内部に線量計を配置することは不可能であるので、都度の照射において最低線量を保障する仕組みも必要となる。

通常の照射プロセスでは、目的とする製品について予め積載形態を定め、その製品配置における、線量分布を把握した上で、積載した荷体のどの部分も、目的とする線量範囲に収まるような、運転条件を設定す

る。線量管理については、決定した積載形態（荷体）の外面等、製品品質に影響の無い場所を管理位置として定め、予め実施する線量分布測定時に、管理点の線量と荷体内部も含めた最小/最大線量位置における線量との関係を把握しておく。日常の製品照射のプロセスでは、積載形態を再現し、管理点の線量をモニターすることで、プロセスの保証を行っている。

本研究のように、複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手順を定めておく必要があると判断された。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。

高圧処理による殺菌に関しては、サルモネラ属菌及び病原大腸菌の菌株間の高圧耐性の差異を検討したところ、サルモネラ属菌ではJCM1652株が250MPaの高圧処理で、0.288logの低減のみを示し、JCM1651株の1.78log、LT2株の2.59logと比較して強い高圧耐性を示した。一方で、LT2株では500MPa処理後に選択培地上での集落形成が見られたことから、他の菌株よりも高い圧力下での損傷菌になりにくい菌株である推察され、高圧耐性と高圧による損傷菌形成性が菌株によって異なることが示された。高圧処理前の保管温度、高圧処理時の温度及び高圧処理後の保管温度について複数の条件を組

み合わせて検討することにより、より高い殺菌効果が得られる条件を模索したところ、サルモネラ属菌で高圧処理前に検体を -20°C で保管した場合に、若干菌数低減効果が高くなる傾向がみられたものの、病原大腸菌では影響は見られなかった。高圧処理時の温度を 25°C から 37°C 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°C 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°C 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。高圧処理後に 42°C 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低減したことから、高圧処理後の加温処理に牛肝臓中の菌数を低減させる効果があることが確認された。高圧処理後の加温処理が、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、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。一方で、高圧処理は検体全体に等しく圧力がかかることから、むらのない処理が可能であり、これまでの検討で各種殺菌方法への抵抗性が比較的強いサルモネラ属菌をある程度低減できたことから、今後の検討により色調変化が問題とならない食肉食品等を対象として活用することで、食品の安全性を高める可能性があると思われる。

E. 結論

牛肝臓等の細菌汚染に関しては、計194頭分の肉用牛由来牛肝臓等を対象として、細菌汚染実態を調査し、以下の知見を得た。

- ・計194頭の肉用牛由来の肝臓からは、EHEC及びサルモネラ属菌は検出されなかった。
- ・肝臓内部における腸内細菌科菌群の最大菌数は 7.1×10^4 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。
- ・ 10^3 CFU/g以上の腸内細菌科菌群が肝臓内部で検出された個体の胆汁からは高率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、肝臓内部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可能性が示唆された。
- ・工程管理は施設間で多様であった。製造加工工程での管理要件としては、検査・整形後の迅速かつ適切な洗浄冷却及

び包装、冷蔵保存に至るまでの区分管理等の徹底が抽出された。

- ・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。
- ・放射線照射による殺菌では、*E. coli* 0157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と判断した。
- ・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、肝臓の線量範囲は、内部も含めて8.59 kGy ~ 9.49 kGy、最大/最小比1.10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実施出来る可能性が示された。
- ・検体数を増やすと、試料の形態のばらつき隣接するトートボックス内の試料の相互作用により、試料表面で測定した線量の範囲が8.69 kGy ~ 9.90 kGy、最大/最小比は1.14に広がった。このため、信頼性が高い連続照射を行うには、試料の密度や配置を照射プロセスごとに精緻に規格化し、その妥当性を検証する手順を確立することが残る課題と考えられた。
- ・今回実施した高圧処理条件では肝臓の硬度は低下傾向を、色調変化は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. 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 線照射によ

る殺菌効果、日本食品科学工学会誌、
65 (2018) 259-263. (2018. 11. 14)

- 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.
- 3) 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)
- 2) 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)
- 3) Y Okada, H Suzuki, Y Momose, H
Ogihara. Inactivation of
foodborne pathogens by HHP
treatment in meats. 10th
International Conference on HPBB.
(2018. 9. 19-20)
- 4) 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 28-30 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」

分担総合研究報告書

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
	渡邊真弘	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
	相馬 要	千葉県東総食肉衛生検査所
	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
	久本千絵、戸嶋章湖	兵庫県食肉衛生検査センター
	近森和加、尾島康世	高知市食肉衛生検査所
	川瀬 遵、安達俊輔	島根県食肉衛生検査所
	大谷公美、清島綾子	福岡県食肉衛生検査所
	城間 健	鹿児島県阿久根食肉衛生検査所

研究要旨：複数の食肉センター及び食肉衛生検査所の協力を得て、平成 28 年度から 29 年度の間には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、平成 30 年度には通常処理され、出荷直前の状態にある牛肝臓等について、肝臓表面、胆嚢内胆汁、肝臓内部（右葉、左葉各 2 部位）の計 6 部位における衛生指標菌の定量試験並びに腸管出血性大腸菌 O157/O26/O111 及びサルモネラ属菌の定性試験を実施した。研究期間を通じて、全供試検体は EHEC 及びサルモネラ属菌陰性を示した。平成 28 年度から平成 29 年度の間に供した計 124 頭の肉用牛由来検体のうち、腸内細菌科菌群が検出された個体は 18 頭（14.5%、最大菌数 4.3×10^3 CFU/g）であった。肝臓内部で腸内細菌科菌群陽性検体のうち、胆汁でも同菌陽性を示した個体の肝臓内部では同菌の広範囲に亘る汚染が認められる傾向にあった。その後、平成 30 年度には通常処理された出荷前の計 70 頭の肉用牛由来検体を調査したところ、腸内細菌科菌群が肝臓内部より検出された個体数は 16 頭（22.9%）と平成 28-29 年度成績に比べ相対的に高値を示し、同指標菌の最大検出菌数は 7.1×10^4 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 頭では肝臓内部も陽性となった。一方、胆汁陰性を示した 62 頭の肝臓内部のうち、52 頭の肝臓内部では同じく同菌陰性となったほか、陽性検体においても概ね 10^1 CFU/g オーダーの検出菌数に留まった。以上の成績から、胆汁中の腸内細菌科菌群検査は、肝臓内部での同指標菌の高濃度汚染を探知する上で有用なスクリーニング法となる可能性が示唆された。また、指標菌成績と各施設の工程管理情報を整理することにより、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して抽出された。これらの衛生対策の更なる普及推進及び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、牛肝臓の実質内（肝臓内部）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を受け、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対策として機能する状況になったものと思料される。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、平成28年度から29年度にかけて、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することとした。その後、平成30年度には、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等を対象として、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収集整理し、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

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。

(v) (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度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)へ移し替え、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1cm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 (RAC または AC プレート、EB プレート、EC プレート) (3M) に接種し、指示書に従い、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。なお、1 自治体で平成 28 年度に採材した検体については採材後約 3 時間の輸送を経て、試験に供しており、上記条件を満たさないことから、本報告の指標菌成績には含めないこととした(データ等については平成 28 年度報告書を参照いただきたい)。

4. EHEC 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°C 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 × 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、サルモネラ属菌及び EHEC の *stn* 遺伝子及び *stx* 遺伝子及び O157, O111, O26 特異的遺伝子を 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。

C. 結果

平成 28~29 年度には食肉センターでとちく解体された計 124 頭の肉用牛の肝臓等

を、平成 30 年度には通常処理された出荷前の肉用牛計 70 頭の肝臓等を対象として、衛生指標菌の定量試験並びに代表的な病原細菌である腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌の定性試験を実施した。

1. EHEC 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、平成 28 年度から 29 年度にかけて衛生的に採材した計 124 頭 × 6 部位 = 744 検体は EHEC 及びサルモネラ属菌陰性を示した。

一方、平成 30 年度に採材した出荷前の計 70 頭 × 6 部位 = 420 検体のうち、1 頭では表面及び実質右葉外側の 2 検体、もう 1 頭では肝臓実質左葉 2 検体で VT 遺伝子が検出された。前者の検体 (表面) では 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) 平成 28 年度成績

(i) 細菌数

表面拭き取り検体では 34 検体中 29 検体が陽性を示し (陽性率 85.3%)、陰性検体も含めた全体の平均値は 2.6×10^4 CFU/100cm² (最大値 : 6.8×10^5 CFU/100 cm²) であった。

胆汁検体については、計 5 検体が陽性を示し (陽性率 14.7%)、最大値は 4.7×10^1 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、それぞれ 4 検体 (陽性率 11.8%) および 5 検体 (同 14.7%) が陽性を示し、実質全体での最大値は、 5.0×10^4 CFU/g、陰性検体も含めた全体の平均値は 5.9×10^2 CFU/g であった。

(ii) 腸内細菌科菌群

表面拭き取り検体では、10 検体から腸内細菌科菌群が検出され（陽性率 29.4%）、最大値は 2.5×10^5 CFU/100cm²であった。

胆汁検体については、3 検体が陽性となり（陽性率 8.8%）、最大値は 3.0×10^1 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、4 検体（陽性率 11.8%）および 5 検体（同 14.7%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 2.9×10^3 CFU/g であった。

(iii) 大腸菌群

表面拭き取り検体では、5 検体から大腸菌群が検出され（陽性率 14.7%）、最大値は 7.4×10^3 CFU/100cm²であった。

胆汁検体では、2 検体が陽性となり（陽性率 5.9%）、最大値は 5.0×10^0 CFU/mL であった。

実質左葉・右葉検体では、共に 3 検体（陽性率 8.8%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 1.4×10^3 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 4 検体（陽性率 11.8%）あり、最大値は 1.3×10^2 CFU/100cm² であった。胆汁検体は全てが検出限界以下であった。

実質左葉・右葉検体では、0 検体および 2 検体（陽性率 5.9%）が陽性を示し、実質全体での最大値は、 1.0×10^2 CFU/g であった。

2) 平成 29 年度成績

(i) 細菌数

表面拭き取り検体では、計 93 頭分のうち 82 頭で陽性を示し（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（最大値： 1.2×10^5 CFU /100

cm²）であった。

胆汁検体では、計 13 頭が陽性を示し、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%）で陽性となり、実質全体の最大値は、 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。

3) 平成 30 年度成績

(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 4.9×10^4 CFU/100cm² (最小値: 2.0×10^1 CFU/100cm²、最大値: 1.1×10^6 CFU/100 cm²) であった。

胆汁検体は計 15 頭が陽性を示し、最大値は 3.6×10^7 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、 9.6×10^4 CFU/g、陰性も含めた全体の平均値は 1.1×10^3 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 2.9×10^5 CFU/100cm² 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 1.1×10^7 CFU/mL であった。

実質は、左葉のみ陽性が 3 頭 (最大値 6.2×10^2 CFU/g)、右葉のみ陽性が 5 頭 (最大値 8.0×10^1 CFU/g)、両葉とも陽性が 8 頭 (最大値 7.1×10^4 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 2.3×10^5 CFU/100cm² 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 8.0×10^6 CFU/mL であった。

実質では、左葉のみ陽性が 2 頭 (最大値 2.9×10^3 CFU/g)、右葉のみ陽性が 8 頭 (最大値 1.6×10^2 CFU/g)、両葉とも陽性が 9 頭 (最大値 3.4×10^4 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 2.3×10^5 CFU/100cm² であった。季節別では、夏季が 15 頭、冬季が 9 頭でそれぞれ陽性を示した。

胆汁は 6 頭が陽性となり (陽性率 8.6%)、最大値は 6.8×10^6 CFU/mL であった。

実質では、左葉のみまたは右葉のみ陽性が各 2 頭 (最大値 2.9×10^2 CFU/g または 6.0×10^1 CFU/g)、両葉とも陽性が 4 頭 (最大値 8.6×10^4 CFU/g) 認められた。

2. 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

平成 30 年度に得られた成績として、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 (表 2-1)。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 (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 6.4×10^3 CFU/g であり、概ね 10^1 オーダー 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 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 8.1×10^5 CFU/mL, 肝実質 6.2×10^2 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。

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・解体された肉用牛より、衛生的な採材を行った牛肝臓等を対象として、衛生状況を調査した上で、通常処理された牛肝臓等を検体とした場合の細菌汚染状況についても調査対象とした。

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は、腸内細菌科菌群が糞便汚染指標として国際的に広く用いられている。同指標菌は、平成28～29年度には計17頭（17/122）の肝実質計16頭の肝実質より検出され、その最大値は 7.1×10^4 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、または検査後には洗浄冷却を十分行わずに保管する等の処理工程を行っていたため、これらの施設で処理された肝実質内部温度は他施設に比べ、穏やかな冷却を呈したと想定される。すなわち、腸内細菌科菌群の増殖制御には肝臓等の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結果と言えよう。

加えて、別施設では処理過程で、臓器別に異なるカゴを用いて区分化を図っていた

が、白物を最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が必須の課題と思われる。

E. 結論

計 194 頭分の肉用牛由来牛肝臓等を対象として、細菌汚染実態を調査し、以下の知見を得た。

- ・ EHEC 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 7.1×10^4 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。

- ・ 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の胆汁からは高率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可能性が示唆された。

- ・ 工程管理は施設間で多様であった。製造加工工程での管理要件としては、検査・整形後の迅速かつ適切な洗浄冷却及び包装、冷蔵保存に至るまでの区分管理等の徹底が抽出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし（投稿準備中）

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

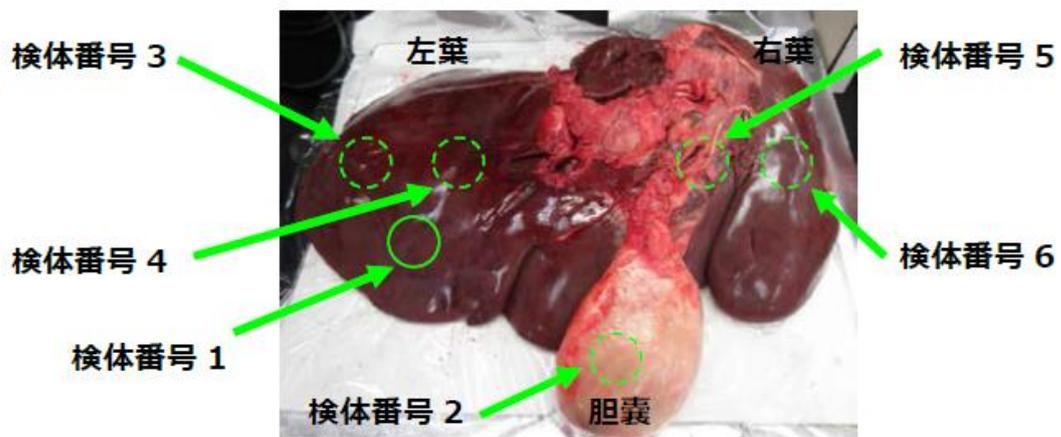


図 1. 採材部位



図 2. 胆嚢内胆汁の採材

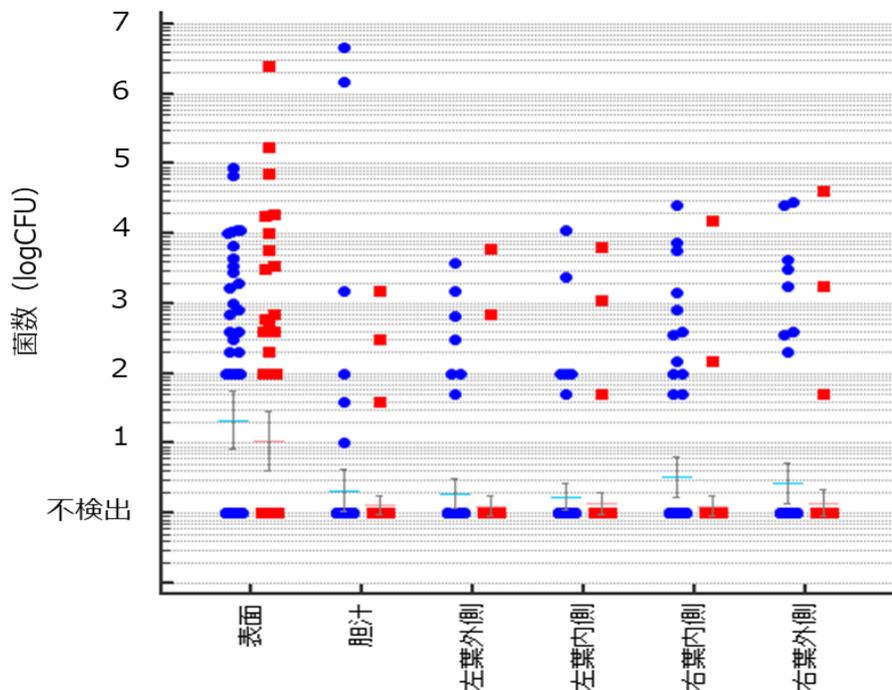


図3. 衛生的に採材した牛肝臓等における腸内細菌科菌群の分布（平成28-29年度）
 表面は100cm²あたり、胆汁は1mlあたり、実質は1gあたりの菌数を示す。
 また、青色は夏季、赤色は冬季の成績を示す。

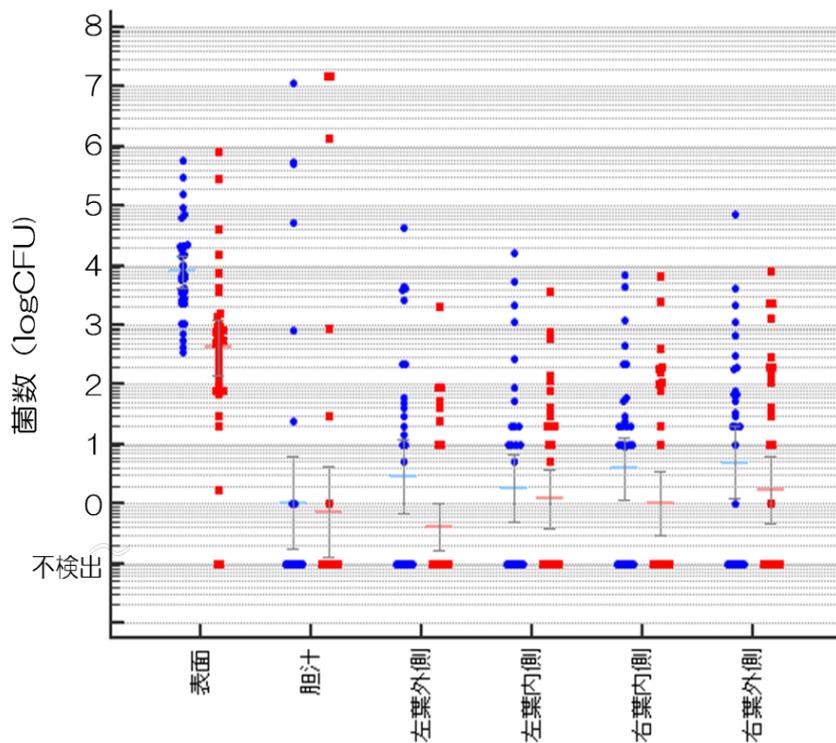


図4. 通常処理・冷蔵保存された牛肝臓等における腸内細菌科菌群の分布（平成30年度）
 表面は100cm²あたり、胆汁は1mlあたり、実質は1gあたりの菌数を示す。
 また、青色は夏季、赤色は冬季の成績を示す。

平成29-30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	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	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	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	中山達哉	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：現在、生食用牛肝臓の提供・販売が禁止されているが、再開に対する要望があり、その可能性を検討するため、摘出後の肝臓等の細菌汚染実態及び冷蔵保管・流通段階における細菌挙動の解明を試みた。まず、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。その後、迅速的に肝臓内部温度を低下させるための手段として冷凍保管の可能性について検討を行った。また、肝臓内部の細菌汚染の指標となる可能性が指摘されている胆嚢内胆汁について、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 の汚染状況を定性又は定量試験によって求めた。最後に、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及び志賀毒素産生性大腸菌 0157 について、胆汁における増殖の可能性を検討した。肝臓内部の温度変化については、肝臓丸ごとを冷蔵室（4℃）で冷蔵した場合には、20℃まで低下するのに約4時間を要した。一方、牛肝臓を冷凍保管（-30℃）した場合には、2時間30分に短縮され、カット（8cm（厚さ）X10X20cm）した場合には2時間で達成できることが判明した。この大きさは肝臓左葉の大きさと同じ程度である。胆嚢内胆汁における腸内細菌科菌群汚染については、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 10^6 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 の増殖性に検討したところ、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判明した。以上のことから、肝臓摘出後は細菌増殖を抑制するため小分け後、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培養検査によって容易に汚染の有無が判断できること、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。しかし、生食に対する要望は依然として存在し、加熱用牛肝臓を生食用として提供した飲食店が摘発されることがある。また、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）。

このような牛肝臓の生食に対する要望に応ずべく、牛肝臓の生食用としての提供・販売の可能性を再検討するためには、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、内臓取扱業者に渡り、胆嚢を切除後、一定時間（半日～翌日）冷蔵室で保管された後、と畜場から出荷される。摘出直後の肝臓の温度は約40℃であるが、重量6～8kg、厚み5～10cm（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るが、その具体的な科学的データは存在しない。また、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、胆汁の腸内細菌科菌群汚染率は知られていない。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蔵・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、サルモネラ及び志賀毒素産生性大腸菌0157の定性又は定量試験を行った。

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翌日午前加工販売業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

冷蔵室における温度変化の測定は、丸ごとの場合には、⑧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（おんどとり）を取り付け、冷蔵室で翌日の出荷までの間の温度を経時的に計測した。小分け冷蔵条件及び冷凍条件の場合には、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°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、冷蔵室（4°C）又は冷凍庫（-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。

まず、事前検討試験として、ミューラー・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°C）したサルモネラ株（LT2 株）を終濃度約 2~3 log cfu/mL となるように胆汁に懸濁し、20°C、30°C 及び 38°C 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°C のみ）。

次に、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、3M 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、3M 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 x 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℃ であり、牛肝臓の丸ごとを冷蔵保管（約 4℃）した場合には、肝臓内部温度が 20℃ 以下（ミュラー・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（図 1）。一方、冷凍保管（-30℃）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）×10×20cm、8（厚さ）×10×10cm 又は 5（厚さ）×10×20cm と小分けにした場合には、2 時間、1 時間半又は 1 時間以内で 20℃ 以下にすることができた（図 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

前年度の事前検討の結果、胆汁中のサルモネラはミュラー・ヒントン培地と同じ増殖性を示し（図 3）、また、胆汁に接種する菌液調整は、ミュラー・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、3.3～3.8 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

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 10⁶cfu/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実施した。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 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、肝臓内部に細菌汚染があった場合には増殖する可能性がある。

今回の研究では、厚さを 8 cmにした場合、冷凍庫 (-30°C) 保管で 20°C (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

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

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（4°C冷蔵室）

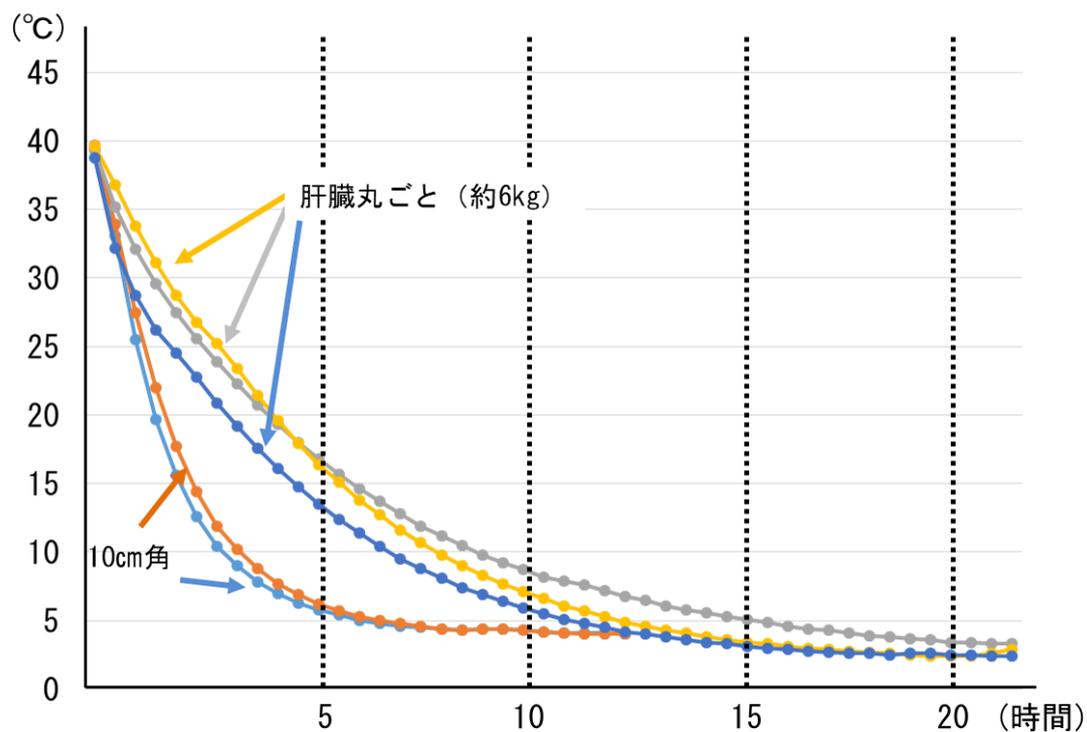


図2 肝臓内部の温度変化（-30°C冷凍庫）

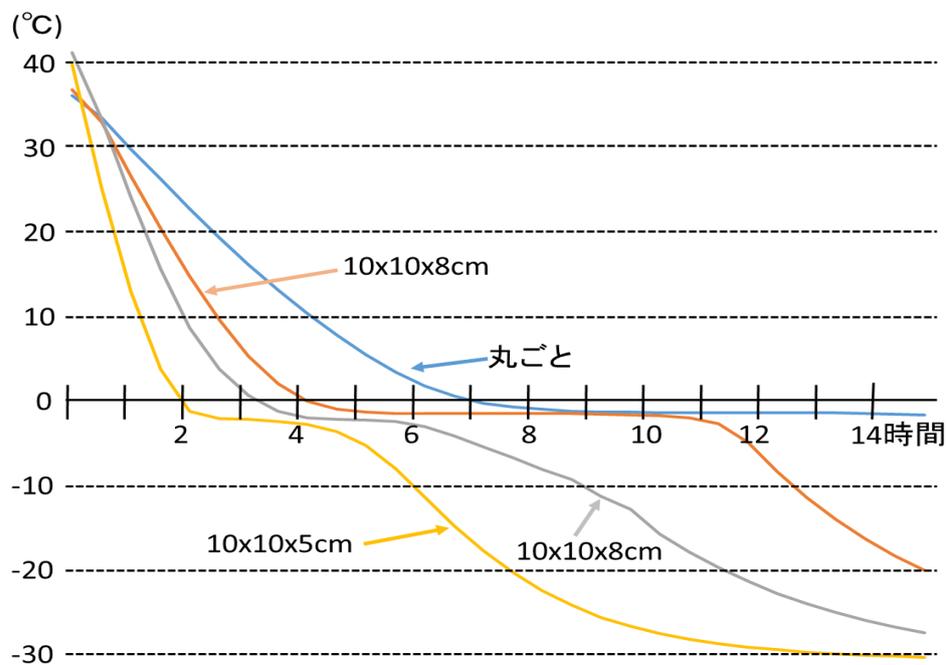


図3 胆汁中におけるサルモネラの増殖能（ミューラー・ヒントン液体培地で前培養）

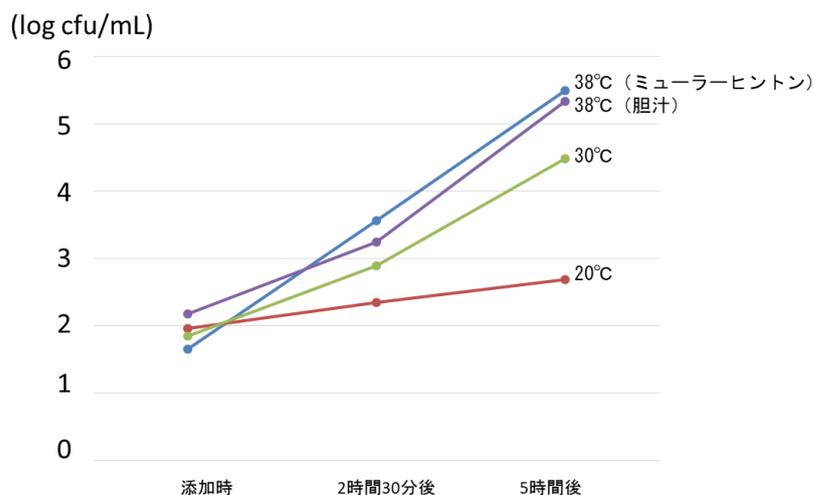


表3 胆汁中におけるサルモネラ及び STEC の増殖性 (log cfu/ml)

菌種	株	培養時間(38°C)	
		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 x 10 ⁶	-	-
2017/11/8	30	黒毛和種	去勢	7.9 x 10 ⁶	-	-
2017/11/15	34	交雑種	去勢	1.4 x 10 ⁷	-	-
2017/11/15	28	黒毛和種	去勢	2.6 x 10 ⁷	-	-
2017/11/20	32	黒毛和種	雌	3.6 x 10 ⁶	-	-
2018/7/9	30	黒毛和種	去勢	1.3x10 ⁷	-	-
2018/7/26	30	黒毛和種	雌	2.4x10 ⁶	-	-
2018/7/26	27	黒毛和種	雌	1.5x10 ⁷	-	-
2018/11/2	35	黒毛和種	雌	5.5x10 ⁶	-	-
2018/11/2	36	黒毛和種	雌	3.1x10 ⁷	-	-
2018/11/19	33	黒毛和種	去勢	5.7x10 ⁶	-	-
2018/12/6	30	黒毛和種	去勢	4.5x10 ⁶	-	-
2018/12/25	31	黒毛和種	雌	6.6x10 ⁷	-	-

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」

総合分担研究報告書

分担課題名 放射線照射による微生物除去

研究分担者：等々力 節子 国立研究開発法人 農研機構 食品総合研究部門
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 $10^4 \sim 10^7$ CFU/g の *Escherichia coli* 0157 DT66 株もしくは *Salmonella* Enteritidis IF03313 株を接種し、4.0~8.1、8.0~12.3 kGy の範囲のコバルト 60 ガンマ線を照射した際の生残試験を行った。過年度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* 0157 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、凍結下、脱気包装状態で 10^5 CFU/g を低減させることが可能であると考えられた。本分担研究のガンマ線照射による生残試験の結果はその予測を反映しており、予測した線量が妥当であると判断できた。

肝臓左葉に、設定した目標範囲のガンマ線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。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、模擬試料を用いたトートボックス内の線量分布の予備的検討から、照射可能な試料の厚みとボックス内の配置を予測し、予測した配置に基づき、2つのトートボックスそれぞれの中心に、凍結状態の肝臓左葉を1つずつ、板状線源に平行に立てるように充填して照射した。その結果、最大厚さ 64mm および 76 mm の2つの肝臓の線量範囲は、内部も含めて 8.6 kGy ~ 9.5 kGy、最大/最小比 1.10 となり、試料・手順・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実施出来る可能性が示された。ただし、検体数を 11 検体に増やして、同様の条件で照射を行うと、箱数の増加による試料配置の再現性の低下や肝臓試料の形体(特に照射方向の厚さ)のばらつき増加により、試料表面で測定した線量範囲でも、8.7 kGy ~ 9.9 kGy、最大/最小比は 1.14 に広がった。これらの検体の最大微生物数は、一般生菌が 10^5 CFU/g、腸内細菌科菌群は 10^3 CFU/g オーダーであったが、照射後は、ともに検出限界以下のレベルに低減された。

以上から、商業施設の連続搬送設備を用いても、目標とする線量範囲での照射が実現可能と考えられるが、高品質な連続照射処理を行うためには、試料のかさ密度や配置を照射プロセスごとに精緻に規格化し、その妥当性を検証する手順を定めることが必要と考えられた。

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が設定された。この規制には解除の要望も多かったことから、今後、生食の安全性を確保する新たな知見が得られれば、必要な管理措置を改めて審議することも答申された。

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。前研究課題において、牛生肝臓を汚染する可能性のある主な食中毒細菌、*E. coli* 0157、*S. Enteritidis* および *Campylobacter jejuni* の牛肝臓中での γ 線照射に対する生残曲線について検討してきており、これらの細菌の放射線感受性の違いを明らかにするとともに、既知の γ 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することが可能となった。

本分担研究課題では、前研究課題を継続して、牛肝臓の生食を想定した際の、ガンマ線による実用的な殺菌条件（線量、照射温度、雰囲気）を確立するとともに、確立した条件を満足する、商業用照射施設での処

理方法について検討することを目的とする。このため、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）における均一な照射により、吸収線量と標的細菌の低減レベルの関係を明らかにするとともに、切り身及び肝臓全体についての線量分布を調べる、②想定される連続照射プロセス（搬送方法及び線源形状などが異なる2種類）について、それらのプロセスにおける線量分布の測定と制御の実効性を確認する、③プロセスにおいて制御可能な線量分布範囲が、①で得られた滅菌線量をカバーすることの検証、の3つの研究を行った。

B. 研究方法

1. 材料

微生物接種試験用の牛肝臓試料は、屠殺直後に凍結した牛肝臓塊を用い、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°C で凍凍保存した。

実用照射に向けた線量分布の検討では、牛肝臓の左葉部分を用いた。また、微生物試験を行う場合は、食肉処理場にて屠殺直後に臓器を取り出し、直ちに肝臓塊より左葉（約0.9 kg～2.74 kg）を切り出して急冷後に農研機構に輸送した。入手した左葉は微生物検査用に一部をサンプリングし、その後、脱気包装し、 -80°C で凍結保存して用いた。

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（ $14 \times 7.5 \times 2.5 \text{ cm}$ 密度約 0.988 g/cm^3 ）を用いた。

2. 供試菌株

供試菌は、*E. coli* 0157 DT66 株ならびに *S. Enteritidis* IF03313 株を用いた。供試菌を Trypticase Soy Broth (TSB; Difco) にて 35°C 一昼夜静置培養した後、遠心分離 (4,000 × g, 10 分間) により菌体を収集、培地成分を除去した。おのおの菌体はリン酸緩衝溶液に再懸濁し、 10^9 CFU/mL となるように調整、これを供試菌液として以降の試験に用いた。

3. ガンマ線照射

ガンマ線照射は、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) のコバルト 60 ガンマ線照射施設 (7 セル) にて静置の両面照射を、あるいは、②コーガアイソトープ株式会社 コバルトガンマ線照射用 1 号機または 3 号機にて、トートボックスを用いた搬送により連続照射を行った。

①量研・高崎研における照射では、1) 肝臓 (25g) を用いた微生物接種試験、および 2) 肝臓左葉全体の線量分布試験を実施した。試料を入れた箱を、板状線源に対する距離と高さ位置を合わせて照射室内に設置し、半分の照射時間で箱内の肝臓試料を裏返し、両面から照射を行った。それぞれの試験における、試料の設置方法の詳細は、H29 年度分担研究報告書 (図 1 及び図 2 上段)、および H30 年度報告書 (図 4) に示した。また、線量率は約 2.5 kGy/h、あるいは 1.5 kGy/h であった。

②の商業用施設では、1) 模擬試料による線量分布予備試験、2) 肝臓左葉試料の線量分布測定試験、3) 自然汚染状態の左葉の殺菌効果確認試験の 3 つの試験を実施した。

この施設に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) が設置されており、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 × 幅 46 cm 高さ 89 cm) を用いる連続搬送設備が付属している。当該施設における、試料搬送の仕組みやトートボックス内での線量分布については、H30 年分担研究報告書 B. 方法の 2 項、および 図 1. に詳細を記載した。なお、試料を凍結状態で照射する際には、照射中の温度を一定に保つため、肝臓試料の前面 (γ 線照射方向) を遮らないよう、試料の背面あるいは上部からドライアイス当て、全体を発泡スチロールの容器に入れた。

4. 接種試験による牛肝臓の殺菌効果確認

菌体の接種は、自然解凍した 25 g 塊の牛肝臓の内部に、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、 $10^4 \sim 10^7$ 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°C の冷凍庫内で 2 時間以上放置して温度を一定にした後、目標線量 4~12 kGy で、①量研 高崎研にて、ドライアイス冷却下でガンマ線照射した。

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。

また、箱内試料(25g)の吸収線量の分布は、予め、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、室温で照射して測定した。アラニンペレットの信号は、ESR装置(Bruker EMX-Plus)で測定し、検量線は英国のNational Physical Laboratory(NPL)の標準アラニンペレットで作成した。

5. 静置照射における線量分布確認

牛肝臓左葉(1,800g、20cm×25cm、厚さ50mm)を厚み方向の中心で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、それぞれ5つずつ線量計を張り付けた(H30分担研究報告 図2)。また、薄切りした肝臓小片を作成し、その5枚を10cm×7cmの発泡スチロール皿に並べ、それぞれの切り身の間および、皿表面に線量計を装着し、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。この試料を2皿分(肝臓重量:84.6g及び87g)作成した(H30分担研究報告 図3)。

左葉試料および2皿分を重ねた切り身試料の厚み方向の中心位置を揃えて発泡スチロール箱に入れ、量研・高崎の照射室(7セル)にて、線源保護板から肝臓の厚さ中心までの距離を30cm、高さ中心を22.5cmとなるように設置し、室温にて両面から照射を行った(H30分担研究報告 図4)。

吸収線量は、前項4.と同様のシステムを用い、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)に取り付けたアラニン線量計(アミノグレイ、日立電線株式会社)と肝臓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)により確認した。

6. 商用施設における連続搬送時の線量分布の予備試験

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段重ね(厚さ2枚分、50mm)または、4段重ね(厚さ4枚分、100mm)の長方体となるように固定し、肝臓の模擬試料とした。この試料の面方向及び厚さ方向の線量分布を測定するため、アルミ蒸着シートに封入したアラニン線量計を各こんにやくの表面及び重ね合わせたこんにやくの間の位置に張り付けた(H30分担研究報告書 図5)。

作成した長方体の模擬試料(縦22cm×横42cm 厚さ:50mmまたは100mm)を、発泡スチロール箱の中央に立てるように設置し、さらに、この箱を、照射装置付属のトートボックスの指定位置に収まるように配置した(H30分担研究報告書 図6)。厚さ50mm(2段重ね)の試料は、厚さ方向の透過力とトートボックス内の位置を大まかに把握するために、トートボックス内に発泡スチロール箱を2つ重ねて入れ、1周で約10kGyとなるように搬送速度を固定している1号機の照射サイクルに合わせて1周(約1時間)の照射を行った。また、厚さ100mm(4段重ね)の試料は、同型のトートボックス内の高さ方向の中心に発泡スチロール箱を1つだけ入れ、最小目標線量を8.2kGyとなるよう、3号機を用いて、搬送サイクルタイム2分5秒で8周照射した。なお、

1号機と3号機は、トートボックスの形状や線源との位置関係はほとんど同等で、箱内線量分布もほとんど同じと考えられるが、コバルト60の数量の違いにより、線量率が異なっている。1号機は、高線量率であり、1週の照射を決められた目標線量となるようなサイクルで運転されていることが多い。本研究では、100 mm厚さの模擬試料については、最低線量を8.2 kGyに合わせるため、低線量率の3号機を用いて、サイクルタイムの調節を行った。なお、模擬試料の照射は、いずれの装置を用いた場合でも室温で実施した。

線量測定は、同商用施設における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の測定により実施した。また同施設でNPLと比較校正して作成した検量線を用いて線量を決定した。線量計の測定は室温で実施した。

7. 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6.44kg）から左葉（重量2.74kgおよび2.04kg）を切り出し、前項4.と同様に、アルミ蒸着シートに封入したアラニン線量計を中心部及び脱気包装後の表面に取り付けた。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バンドで固定し、予備照射と同形の発泡スチロール箱の中央に立てて設置し、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、板状線源と平行のガンマ線照射面を遮らな

いようにドライアイス板を試料の上面に配置した。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含めた発泡スチロール容器は、1つずつトートボックス中に配置し、厚さ100mmの模擬試料と同様に3号機を用いて、コンベアにより、サイクルタイム2分5秒で搬送し、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、ドライアイス温度下で、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。

8. 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、冷蔵状態で農研機構に輸送し、入手直後（と畜後2日目）、方形葉側の一部（25g）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、前項と同様の配置で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。肝臓検体が入っていないボックスには、約2kg分の板状の氷を中心に入れた発泡スチロール箱をダミーとして、装填した。照射装置は前項7.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。

9. 微生物検査

照射前の肝臓検体は、25g を 225mL の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、225mL の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て一昼夜培養した。接種試験の際に、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* 0157 および *Salmonella* 同定キット (Singlepath *E. coli* 0157; Merck Single path *Salmonella*; Merck) に供し、典型集落が *E. coli* 0157 もしくは *Salmonella* 属であることを確認した。

C. 研究結果

1. 接種試験における微生物の殺菌効果

接種試験に先だて、試験用の牛肝臓試料 (25 g, 厚さ約14mm) の線量分布を確認した。発泡スチロール容器 (436 mm(横) × 276 mm(縦) × 136 mm(奥行き))、内径 (400 mm(横) × 240mm(縦) × 100 mm(奥行き)) の蓋の裏側に線量計をつけて包装した肝臓 10個を密着するように2 段に5 個ずつ配置し、肝臓試料の距離方向の中心位置を線源から22cm、試料箱の高さ方向の中心位置をコバルト線源の中心位置 (22.5cm) に合わせて板状線源の正面に設置した (H29分担研究報告 図1. および図2)。目標線量約10 kGy として、半分の照射時間で肝臓試料の前面

後面を反転して両面照射を実施した結果、10 個の肝臓試料の中心部および表面も含め吸収線量は、全体で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1.06が得られた。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0.98~1.03 となり、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た。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。

牛肝臓に $10^4 \sim 10^7$ CFU/g の *E. coli* 0157 ならびに $10^5 \sim 10^7$ CFU/g の *Salmonella* を接種し、ドライアイス下、脱気包装条件でガンマ線照射し、規定の線量で死滅が可能か否かを検討した。前研究課題においては、一定菌数 (10^8 CFU/gレベル) の細菌を肝臓に接種して線量を変えた照射を行い、その生残菌数とガンマ線の吸収線量の関係から、*E. coli* 0157あるいは *Salmonella* の推定死滅曲線を得ており、その際の反復試験により、95%および99%予測信頼区間を算出している。本課題において、菌数濃度を変えて接種した牛肝臓について、様々な線量のガンマ線に曝露した際の検出結果を、推定死滅曲線の予測信頼区間とともに示した (図1、図2)。

図1 に *E. coli* 0157 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%信頼区間外の高いガンマ線の照射域では全ての検体で不検出となった。

図2 には *Salmonella* についての検出結果を示した。 *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%信頼区間外の高いガンマ線照射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。

なお、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、の自然汚染検体（1頭分の牛肝臓）から切り分けた5個の試料（25 g）について、接種試験と同様の配置で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。

2. 静置照射における牛肝臓の線量分布

重量約1,800 g、縦20 cm × 横25 cm、最大厚さ50 mmの肝臓左葉および総重量85~90 gの肝臓を5枚の切り身にして縦10 cm × 横7 cmのトレイに乗せて厚さ10 mmに包装したパックを2つ重ね、厚さ方向を板状線源の正面に向けて両面照射した。照射方向の厚さが20 mmで、ほぼ長方体状に包装された肝臓小片に取り付けた線量計の最大/最小値の比は1.05~1.06程度であった。一方、肝臓左葉の吸収線量の最大/最小比は1.10と、小型パッケージの肝臓小片より大きな分布となったが、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（H30分担研究報告表1）。以上、量研・高崎研での肝臓小片を用いた均一な照射により、吸収線量と微生物の低減レベルの関係を明らかにし、サルモ

ネラおよび *E. coli* 157 5 桁低減に必要な線量予測を検証することができた。また、肝臓左葉全体でも、サルモネラの5桁低減に必要な線量範囲8.2 kGy~10 kGyの照射の実施可能性が示された。

3. 連続照射（商業施設）における模擬試料及び牛肝臓左葉の線量分布

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）58 cm × 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。このボックスを用いて連続照射を行った際の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するため、ガンマ線の照射方向に対して厚さ50 mmとなるように、模擬試料のこんにやく（密度約0.988 g/cm³）をボックス中心に配置し、1号機で照射した際の線量分布測定を行った。その結果、こんにやく層における線量の最大/最小比は1.14であり、サイクルタイムを適切に設定すれば 10^5 CFU/gサルモネラを不活化するのに必要な線量、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（H30分担研究報告図8、表2）。一方、模擬試料の厚さを100 mmとし、3号機を使って最小線量を8.2 kGyとなるようにサイクルタイムを設定して照射した場合の線量はより広範に広がった。最小線量は面方向の中心位置の厚さ中心で、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、最大最小比は1.22となった。

模擬試料の線量分布の確認結果から、80 mmより薄い試料であれば、目的とする線量

範囲での照射が可能と考え、最大厚さ 64mm および最大厚さ 76 mm の 2 つの肝臓を、模擬試料と同等の位置になるように、2 つのトートボックスのそれぞれに 1 つずつ、凍結状態で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。試料の装てん位置および搬送条件は、100mm 厚さの模擬試料の条件を再現し 3 号機を用いて照射を行った。ただし、照射中の温度を保つため、照射方向を遮らないよう試料の上側にドライアイスを載せて冷却した。照射の間に測定した試料温度は -67.9°C ～ -70.1°C であった。線量測定の結果、2 つの肝臓の線量範囲は、 8.59 kGy ～ 9.49 kGy 、最大/最小比 1.10 となった。(H30 分担研究報告 図 10) 以上より、連続プロセスにおいても量研・高崎研で得られた範囲内で線量の制御が可能と結論された。

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 3 号機にて照射した。照射した検体の重量は、 932g ～ $2,350\text{g}$ 、寸法 約 $27\sim 32\text{ cm}$ × $17\sim 28\text{ cm}$ 、最大厚さが 38 mm ～ 57 mm 程度であり、厚さ最大部分と最小部分の肝臓表面に取り付けた線量計の線量範囲は、 8.69 kGy ～ 9.90 kGy 、最大/最小比は、1.14 であった。

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 $7.4 \times 10^2\text{ CFU/g}$ ～ $3.6 \times 10^3\text{ CFU/g}$ 、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 $4.5 \times 10^2\text{ CFU/g}$ 、処理場 B では、一般生菌数 $8.5 \times 10^4\text{ CFU/g}$ ～ $3.2 \times 10^5\text{ CFU/g}$ 、腸内細菌科菌群 8.1×10^2

CFU/g ～ $6.2 \times 10^3\text{ CFU/g}$ 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 (H30 分担研究報告書 表 3)。

D. 考察

1. 牛肝臓の殺菌線量

前課題においては、一定菌数 (10^8 CFU/g レベル) の *Escherichia coli* 0157 DT66 株もしくは *Salmonella* Enteritidis IF03313 株を接種した小型 (25g、厚さ 14mm) の肝臓片に、線量を変えた照射を行い、生残菌を計数することで、線量と生残菌数の対数の直線回帰から、それぞれの菌種に対する D_{10} 値を得た。しかし、低減目標 (例えば 10^5 CFU/g レベル) の菌数を接種した検体を規定の線量で処理した場合に完全に死滅するか否かについては、さらなる確認が必要と考えた。前課題で得た生残菌数のばらつきから、生残曲線の 95% および 99% 予測信頼区間を算出し、特定の菌数を完全に死滅させる線量を予測できると考え、95% および 99% 予測信頼区間と増菌培養による生残判定の結果を合わせて評価した。その結果、*E. coli* 0157 は 95%、*Salmonella* は 99% 予測信頼区間上限よりも高い線量域で照射した際の生残は認められ無かった。従って、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の線量を決定することは妥当と判断した。

2. 牛肝臓左葉の線量分布と商業照射施設における処理の実施可能性

本研究課題の他の分担研究の成果から、肝臓左葉に限定して、菌数低減処理を行う判断をされたことから、この部位の照射形体と線量分布を検討した。

最初に、量研・高崎研の照射室（7セル）において、厚さ50mmの左葉検体を線源保護板から30cmの距離で両面から照射した結果、線量の最大/最小比は1.10であり、厚さを20mmに薄く整形したパッケージに比べて分布範囲は広がるが、左葉全体を照射しても線量範囲8.2~10 kGyでの照射が十分可能と判断された。また、通常、商業ベースで受託サービス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により、定められた搬送経路により、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。トートボックスは施設ごとにことなる大きさを持っており、また、ボックス内の照射試料の位置やボックス内の試料形状などの影響により、吸収線量に分布がある。連続搬送においても、厚み方向の分布を小さくするためには、トートボックスの横幅中心に左葉の厚さ中心を揃え、左葉の両面を板状線源と平行の向きに立てるように配置することが有効と判断された。

本研究では、厚さ50mmと100mmの長方体の模擬試料を使って、ある商業施設において、トートボックス内の指定位置に試料を固定する方法を考案した。模擬試料内の線量分布結果から、厚さ80mm程度の肝臓左葉であれば、当該施設において8.2~10 kGyの範囲での照射が可能と予測した。実際、凍結した牛生肝臓左葉（最大厚さ64mmおよ

び72mm）を厚さ100mmの模擬試料と同位置に配置し、上部からドライアイスで冷却して、模擬試料と同じ搬送条件で照射したところ、線量範囲は8.59 kGy ~ 9.49 kGyに収まり、試料温度も-67.9°C ~ -70.1°Cに保つことが可能であった。そこで、均一な照射場でバッチ的に照射した場合と同様に、連続プロセスにおいても菌数低減の達成度を満たすことが可能と判断した。但し、今回実測した線量は、ドライアイス下で作成した検量線に基づいて測定しているため、実際の照射時の温度条件と検量線作成時の温度のばらつき等の条件を考慮すると、不確かさが常温による測定より大きくなり、正確な評価が難しいため、ドライアイス下での照射プロセスの線量の妥当性の評価には、さらなる検討を要する。

微生物検査のために、最大厚さが38~57mmの11検体の肝臓左葉を、同上の運転条件で照射した際には、最大線量は9.9 kGyとなり、表面に貼り付けた線量計の線量範囲だけでも、最大/最小比は1.14と大きくなった。この照射条件では、左葉の最大厚さ部位の内部の線量が最小に、最小厚さの部位の表面の線量が最大となるとが予測される。従って、線量計を設置していない左葉の内部の線量が、測定した最小線量より、さらに小さくなる可能性がある。但し、肝臓左葉の照射プロセスの実施条件は、厚さが100mmの模擬線量の中心部の最低線量が、8.2 kGyを上回る条件（実測値は8.23 kGy）と同様に設定しており、搬送条件と試料位置が再現出来ていれば、厚さが100mmより十分小さい左葉検体の内部は、目標最低線量の8.2 kGyより大きな線量が照射されていると推定できる。最大線量の9.9 kGyは、

仮に上限線量を 10 kGy とした場合には、線量測定の不確かさを加味した場合に十分な余裕が無い。線量分布の広がり、検体数を増やしたことで、個体間の厚さや形状のばらつきが大きくなったことや、多数のボックスを使用する際のボックス間の相互作用、試料位置の再現性の低下などが原因と考えられ、線量分布をより小さくする工夫が必要となる。また、実試料（製品）では、内部に線量計を配置することは不可能であるので、都度の照射において最低線量を保障する仕組みも必要となる。

通常の照射プロセスでは、目的とする製品について予め積載形態を定め、その製品配置における、線量分布を把握した上で、積載した荷体のどの部分も、目的とする線量範囲に収まるような、運転条件を設定する。線量管理については、決定した積載形態（荷体）の外面等、製品品質に影響の無い場所を管理位置として定め、予め実施する線量分布測定時に、管理点の線量と荷体内部も含めた最小/最大線量位置における線量との関係を把握しておく。日常の製品照射のプロセスでは、積載形態を再現し、管理点の線量をモニターすることで、プロセスの保証を行っている。

本研究のように、複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位置に装填する手順を定めておく必要があると判断された。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. 結論

牛肝臓に $10^4 \sim 10^7$ CFU/g の *Escherichia coli* 0157 DT66 株もしくは *Salmonella Enteritidis* IF03313 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。過年度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* 0157 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と判断した。ガンマ線による曝露試験の結果はその予測を反映しており、微生物低減手法としての有用性が検証できた。

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、肝臓の線量範囲は、内部も含めて 8.59 kGy ～ 9.49 kGy、最大/最小比 1.10 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実施出来る可能性が示された。ただし、検体数を増やすと、試料の形態のばらつき隣接するトートボックス内の試料の相互作用により、試料表面で測定した線量の範囲が 8.69 kGy ～ 9.90 kGy、最大/最小比は 1.14 に広がった。これらの検体の自然汚染における最大微生物数は、一般生菌が 10^5 CFU/g オーダー、腸内細菌科菌群 10^3 CFU/g オーダーであり、プロセスの形態が異なっても、照射後は、ともに検出限界以下のレベルに低減された。以上から、商業施設の連続搬送設備を用いても、目標とする線量範囲での照射制御が実現可

能と考えられる。信頼性が高い連続照射を行うために、試料の密度や配置を照射プロセスごとに精緻に規格化し、その妥当性を検証する手順を確立することが残る課題と考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 4) 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.
- 5) 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

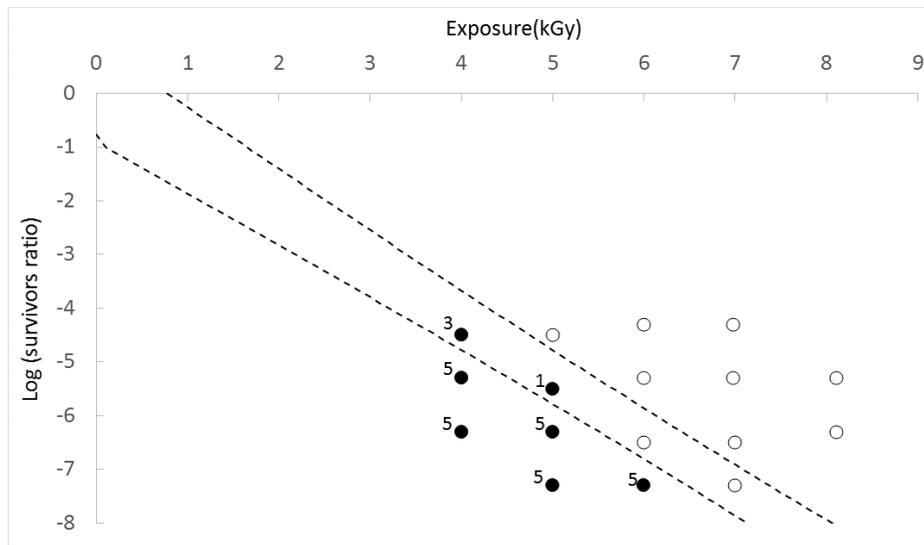


図1. *E. coli* O157の推定死滅曲線の95%予測信頼区間と、実際の接種区での生死判定結果。（ドライアイス下、脱気包装）

牛肝臓25gに、 $10^4 \sim 10^7$ CFU/gの*E. coli* O157 DT-66株を接種しガンマ線照射後、全検体を、増菌培養後にVRBG培地上に生存コロニーが、出現するか否かの+/-判定試験を行った。（反復数5）

○ 5検体すべて陰性（死滅）、● 無印は陽性（生残）、添え字は5検体中の陽性数

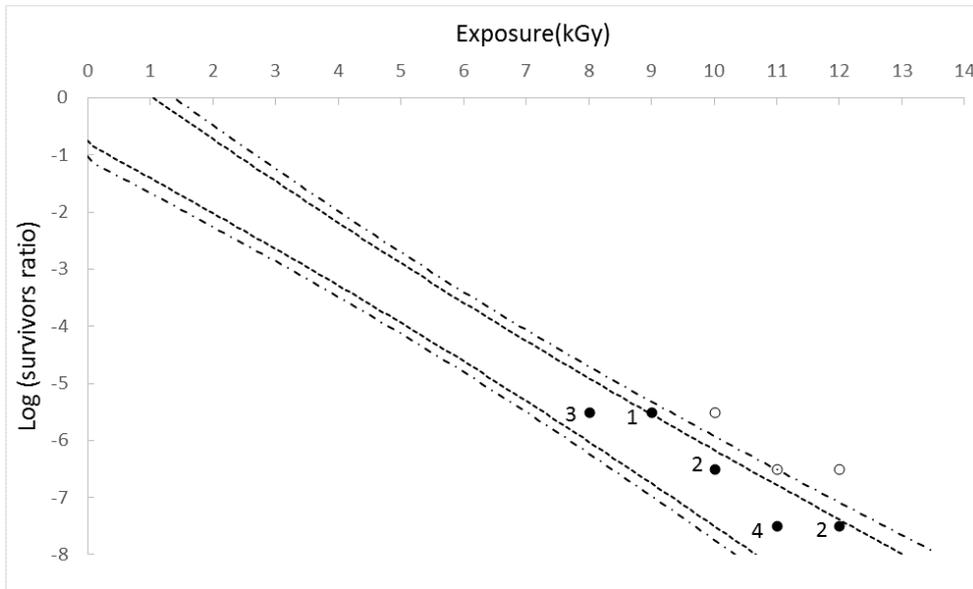


図2 . *S. Enteritidis* 3313 の推定死滅曲線の95%予測信頼区間(点線)および99%予測信頼区間(一点鎖線)と、実際の接種区での生死判定結果。(ドライアイス下、脱気包装)

牛肝臓25gに、 $10^5 \sim 10^7$ CFU/gの*S. Enteritidis* 3313株を接種しガンマ線照射後、全検体を、増菌培養後にVRBG培地上に生存コロニーが、出現するか否かの+/-判定試験を行った。(反復数5)

○ 5検体すべて陰性(死滅)、● 無印は陽性(生残)、添え字は5検体中の陽性数

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
	吉田 麻利江	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
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所
	渡邊 真弘	一般財団法人 日本冷凍食品検査協会

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及び衛生指標菌の低減手法について検討した。平成 28 年度は高圧処理前の保管温度、高圧処理時の温度及び高圧処理後の保管温度について複数の条件を組み合わせて検討し、300MPa 5 分間を 2 回反復する処理により、牛肝臓に接種したサルモネラ属菌は 1.26~2.15 log の、病原大腸菌は 1.41~2.22 log の低減を示した。サルモネラ属菌は高圧処理前に検体を -20°C で保管した場合に菌数低減効果が高くなる傾向がみられた。一方病原大腸菌では、処理前後の冷凍保管による菌数低減効果は見られなかった。サルモネラ、病原大腸菌のいずれにおいても、高圧処理後の選択分離培地の集落数がと非選択培地上よりも著しく低く、高圧処理により損傷菌が発生していると思われた。平成 29 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。300MPa 5 分間を 3 回反復する高圧処理を、室温、 37°C 及び 42°C の各温度帯で行ったところ、サルモネラ属菌は 25°C で 1.5~2.1 log、 37°C で 3.2~3.6 log、 42°C 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°C で 6.0~6.6 log、 37°C で 7.0~7.7 log、の低減を示し、 42°C 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°C 及び 42°C 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。平成 30 年度は、高圧処理後の加温処理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°C 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 1.43~1.82 log の低減を示した。高圧処理のみで加温処理をしない検体では、0.59~0.78 log 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 低減することが明らかとなった。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、牛肝臓中の高圧処理後に加温処理を行うことで、食中毒菌の菌数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）では肝臓の肉食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ものの、肉眼的に感知しうる程度の変色が見られた。

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。過去の研究により、牛等の肝臓からは腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラ、リステリア、E型肝炎ウイルス等の病原微生物が検出されている。日本国内では食肉及び内臓肉に関連した食中毒事例がしばしば報告されており、特に微量の摂取でも感染が成立しうる腸管出血性大腸菌やサルモネラ属菌などによるものが知られている。食肉中の病原微生物の除去には、十分な加熱による調理と取り扱いの衛生管理が重要であるが、加熱処理により食材が変性するため、生食には適さない。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。本研究では、牛肝臓の肉食変化を抑制しつつ、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、高圧処理と処理前後及び処理時の温度の組み合わせによる検討を行った。

B. 研究方法

(1) 供試菌株

平成28年度の検討では、*Salmonella*

Typhimurium LT2株、*Salmonella enterica* JCM1651株、*Salmonella enterica* JCM1652株、enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) HP1001株、enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) WH01株、enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) EDL933株及びenteroaggregative *E. coli* (EAEC) PEZ株を用いた。サルモネラ菌株及び病原性大腸菌株は-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及び牛肝臓への添加試験に供した。平成29年度の検討では、*S. enterica*の内前年度の検討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。

(2) 検体

菌液を用いた高圧処理試験では、(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。

高圧処理を行う牛肝臓は、芝浦臓器株式会社から購入し、冷蔵状態で運搬した。接種試験用の検体は10g片に切断し、滅菌した高圧処理用袋に分包後、菌液を接種した。バキュームシーラーを用いて袋をシールしたのち、滅菌蒸留水を入れた外袋内で更にシールして密封した。硬度及び色彩を測定する肝臓検体は25g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（平成28年度報告書図1：神戸製鋼株式会社）を用いて250 MPa及び500 MPaでの高圧処理を行った。

牛肝臓中に接種した病原菌に対する殺菌効果の測定のための高圧処理は、300 MPa、5分を2回反復する条件で行った。処理温度は-20℃から20℃の範囲に設定した。高圧処理前後の温度は、-20℃から4℃の範囲に設定した。

高圧処理による牛肝臓の硬度及び色調の変化を測定するため、菌を接種しない肝臓検体に250 MPa、300 MPa及び400 MPaの圧力で5分間処理する条件で行った。処理温度は-20℃又は4℃の範囲に設定した。高圧処理前の温度は、-80℃から4℃の範囲に設定した。平成29年度の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。平成30年度は、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) 加温処理

平成29年度の牛肝臓における加温下での高圧処理の対照群として、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。平成3年度の加温処理は、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。

(5) 菌数測定

平成28年度の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BHI寒天平板及びCHROMagarサルモネラ平板に、病原大腸菌では

BHI寒天平板及びTBX寒天平板に塗布後、37℃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。牛肝臓中に接種したサルモネラ属菌に対する殺菌効果の測定は、高圧処理後の検体を9倍量の滅菌生理食塩水中でストマッカー処理して10倍乳剤を作成し、各100 µLをBHI寒天平板及びCHROMagarサルモネラ平板に塗布後、37℃で好気培養を行い、24及び48時間後に定型集落の計数を行った。平板に発育した定型集落数と希釈倍率から、高圧処理前及び処理後の検体中の菌数を算出した。病原性大腸菌の殺菌効果の測定は、サルモネラ属菌と同様に10倍乳剤を作成し、BHI寒天平板及びTBX寒天平板に塗布後、37℃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。平成29年度の菌液を用いた高圧処理試験では、平成28年度と同様に菌液の塗布を行ったのち、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。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。

(6) 硬度及び色調

未処理、高圧等の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) サルモネラ属菌と病原大腸菌の菌株間での高圧耐性

サルモネラ属菌3菌株と、病原大腸菌4菌株に

ついて、250 MPa 及び 500 MPa の高圧処理後の生残性を測定することにより、高圧耐性の比較を行ったところ、サルモネラ属菌では JCM1652 株が 250 MPa 及び 500 MPa における生残性が最も高い結果を示した。病原大腸菌では、EHEC EDL933 株が 250 MPa 及び 500 MPa における生残性が最も高い結果を示した。EHEC EDL933 株は他の株と比べ、500 MPa 処理後の非選択培地上の集落数と選択培地上の集落数の差が少なく、検討した株の中で損傷菌となりにくい傾向が最も強かった。以上の結果より、牛肝臓への接種試験にはもっとも強い高圧耐性を示した *S. enterica* JCM1652 株と EHEC EDL933 株を用いた。

(2) 高圧処理前後の保管温度がサルモネラ属菌及び病原大腸菌の菌数低減に及ぼす影響

高圧処理前の保管温度、高圧処理時の温度及び高圧処理後の保管温度について複数の条件を組み合わせ、300MPa、5分2回反復の高圧処理を行った結果の菌数を平成28年度報告書表1-2及び2に示した。牛肝臓に接種したサルモネラ属菌は1.26~2.15 log の、病原大腸菌は1.41~2.22 log の低減を示した。サルモネラ属菌は高圧処理前に検体を-20°Cで保管した場合に、菌数低減効果が高くなる傾向がみられた。一方病原大腸菌では、処理前後の冷凍保管による菌数低減効果は見られなかった。サルモネラ属菌、病原大腸菌のいずれにおいても、高圧処理後の選択分離培地の集落数は非選択培地上よりも著しく低く、高圧処理により損傷菌が発生していると思われた。

(3) 高圧処理が牛肝臓の色調と硬さに及ぼす影響

高圧処理による牛肝臓の肉色及び硬さの変化を測定した結果を平成28年度報告書表2に、写真を同図3に示した。処理前に4°Cで保管し、高圧処理を4°Cで行った場合(条件1-3)、硬さを示す最大破断点の加重は、圧力に比例して高くなる傾向を示した。処理前に検体を-20°Cで保管し、4°Cで高圧処理を行った場合は(条件4-6)、いずれの

圧力でも硬さが同程度増す傾向が見られた。一方、処理前に検体を-80°Cで保管し、-20°Cで高圧処理を行った場合(条件7-9)、250 MPa の処理では検体の硬さに大きな変化はなく、400 MPa の処理後の検体が柔らかくなる傾向が示された。牛肝臓の肉色については、処理前に4°Cで保管し、高圧処理を4°Cで行った場合(条件1-3)、明るさを示すL値、赤みを示すa値及び黄みを示すb値共に、圧力に比例して高くなる傾向を示した。処理前に検体を-20°Cで保管し、4°Cで高圧処理を行った場合は(条件4-6)、250 MPa 及び 300 MPa においてL値、a値及びb値共に、4°C保管時よりも数値が高くなる傾向が見られた。一方、処理前に検体を-80°Cで保管し、-20°Cで高圧処理を行った場合、250 MPa (条件7)の処理ではL値の低下が見られ、300 MPa(条件8)では条件5と同様の色調を示した。一方、400MPa(条件9)では条件3及び条件6と比べ、色調変化が少ない傾向が示された。また、高圧処理後の牛肝臓は、圧力に比例して切断端が丸みを帯びる形態変化が見られた(平成28年度報告書図3-1~4)。高圧処理を行わない場合の、冷蔵及び冷凍保存による肝臓の肉質変化は、特に認められなかった(平成28年度報告書図3-5~7)。

(4) 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°Cで1.5~2.1 log、37°Cで3.2~3.6 log、42°Cで5.2~6.4 log の低減を示した(平成29年度報告書図1-1)。リステリアモノサイトゲネスでは、25°Cで6.0~6.6 log、37°Cで7.0~7.7 log、の低減を示し、42°C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(平成29年度報告書図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。

(5) 高圧処理時の温度が牛肝臓の肉質変化に及ぼす影響

(4)と同じ条件で牛肝臓の高圧処理を実施したところ、25°C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°C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°Cの処理では3.608から1.542と大幅に軟化していた(平成29年度報告書図2)。高圧をかけない加温のみの処理では、37°Cで5.780から3.218、42°C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°C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°C及び42°Cの処理においても同様の傾向を示したが、25°C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。

(6) 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1.82~2.54log CFU/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の菌数低減を示した(平成30年度報告書表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0~2.33log CFU/g、大腸菌は0~2.42log CFU/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(平成30年度報告書表2)。

(7) 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

(6)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°C1時間の加温処理のみでは6.28387、300MPa10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°C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(平成30年度報告書図1)。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

サルモネラ属菌及び病原大腸菌の菌株間の高圧耐性の差異を検討したところ、サルモネラ属菌ではJCM1652株が250MPaの高圧処理で、0.288logの低減のみを示し、JCM1651株の1.78log、LT2株の2.59logと比較して強い高圧耐性を示した。一方で、LT2株では500MPa処理後に選択培地上で

の集落形成が見られたことから、他の菌株よりも高い圧力下での損傷菌になりにくい菌株である推察され、高圧耐性と高圧による損傷菌形成性が菌株によって異なることが示された。高圧処理前の保管温度、高圧処理時の温度及び高圧処理後の保管温度について複数の条件を組み合わせて検討することにより、より高い殺菌効果が得られる条件を模索したところ、サルモネラ属菌で高圧処理前に検体を -20°C で保管した場合に、若干菌数低減効果が高くなる傾向がみられたものの、病原大腸菌では影響は見られなかった。高圧処理時の温度を 25°C から 37°C 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°C 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°C 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。高圧処理後に 42°C 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低減したことから、高圧処理後の加温処理に牛肝臓中の菌数を低減させる効果があることが確認された。高圧処理後の加温処理が、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、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。一方で、高圧処理は検体全体に等しく圧力がかかることから、むらのない処

理が可能であり、これまでの検討で各種殺菌方法への抵抗性が比較的強いサルモネラ属菌をある程度低減できたことから、今後の検討により色調変化が問題とならない食肉食品等を対象として活用することで、食品の安全性を高める可能性があると思われた。

E. 結論

本研究では、高圧処理前後の保管温度が牛肝臓中のサルモネラ属菌及び病原大腸菌菌数に与える影響を検討したところ、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、冷凍保存しないものに比べ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。また、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ものの、肝臓の色調が白化及び黄化する傾向が示された。高圧処理後に1時間加温処理を行うことによる衛生指標菌の低減効果に与える影響を検討したところ、高圧処理後に 42°C 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、今回実施した条件では肝臓の硬度は低下傾向を、色調変化は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。以上の研究から、高圧処理のみで肝臓の肉食を変化させることなく、生食用としての提供可能なレベルへの菌数低減は難しいことが示された。一方で、高圧処理は検体全体に等しく圧力がかかることから、むらのない処理が可能であり、今後の検討により色調変化が問題とならない食品を対象に活用することで、食品の安全性を高める可能性があると思われた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

原著論文 : 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)
2. 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)
3. Y Okada, H Suzuki, Y Momose, H Ogihara. Inactivation of foodborne pathogens by HHP treatment in meats. 10th International Conference on HPBB. (2018. 9. 19-20)
4. 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)

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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 γ 線照射による殺菌効果 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	65	259-263	2018
Kawasaki S., et al.	Inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157 and <i>Salmonella</i> Enteritidis in raw beef liver by gamma irradiation.	Food Microbiology	78	110-113	2019